



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDIO DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS PRESENTES  
EN MACROALGAS DE  
LAS COSTAS GALLEGAS**

Carolina Gonçalves Fernández

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENXEÑARÍA QUÍMICA E  
AMBIENTAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018







## DECLARACIÓN DA AUTORA DA TESE

### **Estudio de compuestos bioactivos presentes en macroalgas de las costas gallegas**

Dna. Carolina Gonçalves Fernández

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Santiago de Compostela, 16 de Outubro de 2018.*

Asdo. Carolina Gonçalves Fernández





## AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DA TESE

### Estudio de compuestos bioactivos presentes en macroalgas de las costas gallegas

D. Jorge Sineiro Torres

D. Oreste Gualillo

INFORMAN:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. **Carolina Gonçalves Fernández**, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directores desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 16 de Outubro de 2018.*

Asdo. Jorge Sineiro Torres

Asdo. Oreste Gualillo



*A mi padre, cuya fuerza  
aún es capaz de impulsarme.*





## AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar dándole las gracias a la persona que una mañana me invitó a venir a la ETSE para conocer a las personas que después me acompañarían en este viaje, gracias María José.

También quiero agradecerle a Jorge y a Marivel su acogimiento y cercanía cuando llegue al laboratorio. Con Marivel comencé mis primeros ensayos y siempre recordaré aquellas primeras nociones de lo que hacer y no hacer, de la importancia de llevar a cabo un estricto seguimiento de todo lo que se hace desde el momento en el que entras por la puerta del laboratorio y te pones la bata. De igual modo, agradezco los buenos consejos de Loli y de Santi, quienes me ayudaron cuando me asaltaban las dudas y quienes escucharon tanto mis peleas con el caliper como mis batallas con las células. Gracias a Chenlo, por los buenos consejos y por valorar el trabajo que hay detrás de una tesis y que nunca saldrá a la luz. Gracias a Miguel, a Pablo, a Blanquita, por esas tardes compartiendo risas. No quiero olvidarme de Moncho, a quien siempre recordaré por sus entradas triunfales por la puerta del laboratorio. Gracias por todos esos buenos momentos y gracias por tus consejos, aunque no siempre vengan maquillados muchas veces son mejor que un buen maquillaje.

Gracias Ana, por tu llegada y por esa conexión León-Salamanca que ya sabes que cruzará fronteras. Ahora ya podemos decir “Ancha es Castilla”.

Gracias Jorge, no me llegaría el papel para agradecerte el tiempo que has estado aquí cuando tenías mil cosas que hacer. Gracias por todo lo aprendido y por ayudarme a llevar esta tesis adelante, porque sin tú ayuda no hubiera sido posible. Gracias por ello, por ayudarme a juntar dos mundos, el de la ingeniería química y el de la biomedicina. Me quedo con todo lo aprendido, con tu capacidad de trabajo y con esa tranquilidad que transmites cuando otras personas abrían salido corriendo. Gracias por todas esas tardes de trabajo y risas que he pasado en el laboratorio, que me recordaron que el trabajo no está reñido con los buenos momentos.

Gracias a Oreste por acogerme en su laboratorio y darme la oportunidad de meterme en el pequeño mundo de las células donde todos los pequeños logros acaban siendo grandes. Gracias a todos los

chicos del IDIS, especialmente a Vero, Montse, Clara, Ana, Vane, Rudy, María, Vera y todos los que habéis compartido momentos junto a mí. Especialmente a Vero, por todos esos momentos en la sala de cultivo y por acabar siendo realmente una amiga.

Gracias a Teresa y Alejandrina por acogerme en su laboratorio durante mi estancia en Coimbra. Gracias a todos los chicos, a Ana, Isa, João, Victor, João R., gracias por estar ahí y acogerme con una sonrisa siempre que regreso.

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres que han sido los mejores que podía tener. Gracias mamá, por estar ahí desde el minuto cero y apoyarme en todo lo que he hecho, aunque eso implicara estar lejos de ti. Gracias a mi padre, quien me dejó abrir las alas y cuyo corazón me enseñó que muchas veces perdiendo se gana. Gracias a mis hermanos, por ser parte de mí y por hacerme sentir orgullosa de vosotros. Cada día que pasa somos una piña más grande y la distancia no hace más que unirnos más fuerte.

Gracias a todos mis amigos, quienes siempre habéis estado ahí a lo largo de todos estos años. Especialmente a Almu, Sara, Oli, Jesús, Álex, Pau, Iri, Simón, Jota, Héctor, Inés, Ana, Pau, Almudena. Gracias a todos por estar ahí, para lo bueno y para lo malo, mis queridos ourensanos. Sois la familia que he elegido y sin vosotros, mi camino hasta aquí no hubiera sido lo mismo. Han sido muchos momentos que he pasado con vosotros y aún me saben a poco. ¡Os quiero chicos!

Por último, quiero agradecer a todas las personas cuyo apoyo fue importante para la elaboración de esta tesis, gracias a Vero Piñeiro de Lugo y a Manuel Martín del Cactus de Santiago.



## RESUMEN

Esta tesis fue realizada con la finalidad de aislar y estudiar compuestos bioactivos de interés presentes en macroalgas de las costas gallegas, *Fucus vesiculosus* y especialmente la poco estudiada alga *Bifurcaria bifurcata*, alga presente en el atlántico Este y entre Marruecos y Alemania. Esta macroalga está presente en las costas de Galicia y hoy en día, apenas existen publicaciones relacionadas con esta alga a partir de ejemplares de las costas de la península ibérica, por lo que es de interés su estudio y su puesta en valor.

Por lo tanto, la tesis se basa principalmente en la extracción de compuestos bioactivos y su valoración como bioactivos de interés, bien sea como antioxidantes o como otro tipo de acción, como bien puede ser antiinflamatoria o citotóxica. Existe asimismo un creciente interés en relación a la bioactividad de extractos procedentes de macroalgas y microalgas. En el campo de la biomedicina, hoy en día se están descubriendo multitud de compuestos bioactivos con potencial actividad antitumoral.

A pesar del creciente interés, la aplicabilidad de los resultados obtenidos en estas investigaciones viene un poco limitada porque se llevan a cabo con los extractos de las algas y no con fracciones más definidas. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios de fraccionamiento con el objetivo de identificar los compuestos que causan estas bioactividades y orientar la investigación hacia compuestos particulares que puedan ser eventualmente sintetizados. En esta tesis se empleó la actividad antioxidante, aplicando varias metodologías, como criterio para establecer condiciones en las que obtener actividad biológica de interés. Se empleó una de ellas, el ensayo de inhibición de DPPH, para establecer condiciones de pretratamiento de las algas como el secado y la extracción.

En esta tesis se obtuvieron fracciones de polifenoles y de fucoidanos. Las fracciones de florotaninos se obtuvieron por preconcentración empelando resinas de Amberlite y sometiendo los eluidos a cromatografía semipreparativa en fase reversa empleando columnas C18. Otras fracciones activas, conteniendo florotaninos juntamente con otros componentes, se obtuvieron mediante un proceso de extracción acuosa asistida por ultrasonidos, microfiltración

a través de membranas cerámicas y posterior cromatografía preparativa con fase estacionaria C18.

Los estudios *in vitro* llevados a cabo permitieron obtener fracciones con un potencial citotóxico frente a líneas tumorales de ratón y dejó abierto el camino al estudio de dicha citotoxicidad en otras líneas tumorales humanas. Esto se vio apoyado con el hecho de que las mismas fracciones que provocaban citotoxicidad frente a células tumorales no provocaban mortalidad de macrófagos. Esto último es importante en la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica que no maten a los macrófagos permitiendo que estos actúen beneficiosamente atacando a las células tumorales.



## SUMMARY

This thesis has been developed with the aim of isolating and studying interesting bioactive compounds present in macroalgae from Galicia, *Fucus vesiculosus* and specially from the scarcely studied *Bifurcaria bifurcata*. This seaweed is present in the Eastern coast of Atlantic Ocean, from Morocco to Germany. The publications that consider the study of this seaweed from Iberian coasts are very scarce, which make interesting its study and potential valorisation.

Thus, this thesis is focused on the extraction of bioactive compounds for its further valorisation as interesting bioactives, being either merely antioxidants or acting as anti-inflammatory or cytotoxic compounds. There also exists an increasing interest in the research of bioactivity of extracts derived from macroalgae and microalgae. Nowadays, in the field of biomedicine, many compounds with potential antitumoral activity are being discovered.

Despite the increasing interest, the applicability of the results reported in many papers is limited by the fact that direct extracts from the algae were used, instead of applying more chemically-defined fractions. Thus, it is necessary to fractionate the extracts to reduce the uncertainty regarding the components that can cause bioactivities and address the research towards components that could eventually be synthesized.

The antioxidant activity using several methodologies was set as criterium to stablish the conditions for which interesting biological activity could be obtained. One of them, the radical DPPH scavenging activity was employed to assess the seaweed pre-treatment conditions, such as those for drying and extraction.

Fractions enriched in phlorotannins and fucoidans were isolated in this research work. Phlorotannins were obtained by preconcentration through Amberlite resins and the eluates subjected to reversed-phase semipreparative chromatography using C18 columns. Different active fractions, containing phlorotannins together with other components, were obtained from ultrasound-assisted aqueous extraction, microfiltration through ceramic membranes and subjected to preparative C18 chromatography. Fractions enriched in fucoidans were obtained after carbohydrates extraction and further precipitation

with ethanol, ion-exchange chromatography using weak anionic exchange Sepharose CL-6B, dialysis and molecular weight cut-off using 3500 Da molecular size.

The in vitro assays presented in this Thesis permitted the obtaining of fractions with cytotoxic activity against tumour cell lines from mice and less the way addressed to obtain fractions showing the same activity on human tumour cell lines. This research line is supported by the fact that the obtained fractions did not show cytotoxicity on human macrophage cells. This finding is very important in the search for cytotoxic compounds that do not cause macrophage death, thus allowing these ones to attack the tumour cells.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Macroalgas como fuente de compuestos bioactivos.....	1
1.1.1. Antecedentes.....	1
1.1.2. Aplicaciones de las algas en la industria .....	3
1.1.3. Las algas y la industria cosmética .....	3
1.1.4. Las algas en la industria alimentaria.....	4
1.1.5. Las algas y su papel en la medicina.....	5
1.1.6. Otras aplicaciones.....	5
1.2. Distribución de las macroalgas en el litoral.....	7
1.2.1. Zonación litoral .....	7
1.3. Clasificación de las macroalgas o algas marinas .....	9
1.3.1. Las algas verdes.....	9
1.3.2. Las algas rojas .....	9
1.3.3. Las algas pardas.....	9
1.4. Algas pardas como fuente de compuestos bioactivos.....	10
1.4.1. Florotaninos .....	10
1.4.1.1. Fucosles .....	12
1.4.1.2. Floretoles.....	13
1.4.1.3. Fuhaloles .....	13
1.4.1.4. Hidroxifuhaloles.....	14
1.4.1.5. Fucofloretoles.....	14

1.4.2.	Fucoidanos .....	14
1.4.3.	Alginatos .....	17
1.4.4.	Carotenoides .....	19
1.5.	Factores que influyen en el desarrollo de las algas .....	20
1.5.1.	Luz .....	20
1.5.2.	Temperatura .....	20
1.5.3.	Nutrientes .....	21
1.5.4.	Salinidad .....	22
1.5.5.	Oxígeno .....	22
1.5.6.	Exposición al oleaje .....	23
1.6.	Especies bajo estudio .....	23
1.6.1.	<i>Bifurcaria bifurcata</i> .....	23
1.6.1.1.	Clasificación .....	23
1.6.1.2.	Distribución y hábitat .....	23
1.6.1.3.	Morfología .....	24
1.6.1.4.	Ciclo de vida .....	24
1.6.2.	<i>Fucus vesiculosus</i> .....	25
1.6.2.1.	Clasificación .....	25
1.6.2.2.	Distribución y hábitat .....	25
1.6.2.3.	Morfología .....	26
1.6.2.4.	Ciclo de vida .....	27
<b>2.</b>	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>29</b>
2.1.	Procesado de macroalgas .....	29
2.1.1.	<i>Bifurcaria bifurcata</i> .....	29

2.1.1.1.	Obtención .....	29
2.1.1.2.	Procesado .....	29
2.1.1.3.	Conservación.....	30
2.1.2.	<i>Fucus vesiculosus</i> .....	30
2.1.2.1.	Obtención .....	30
2.1.2.2.	Procesado .....	30
2.1.2.3.	Conservación.....	31
2.2.	Métodos de análisis.....	31
2.2.1.	Polifenoles totales.....	31
2.2.1.1.	Preparación de la muestra .....	31
2.2.1.2.	Procedimiento.....	32
2.2.2.	Capacidad donante de protones.....	33
2.2.2.1.	Disolución de DPPH• en metanol .....	33
2.2.2.2.	Preparación de la muestra .....	34
2.2.2.3.	Curvas decaimiento de DPPH vs. tiempo .....	34
2.2.3.	Actividad antioxidante mediante ensayo FRAP ....	35
2.2.3.1.	Preparación de tampón acetato 300 mM pH 3,6 .....	35
2.2.3.2.	Preparación de disolución ácida de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM del radical ABTS'+.....	35
2.2.3.3.	Mezcla reactivo FRAP .....	36
2.2.3.4.	Preparación de patrones de FeCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O .....	36
2.2.3.5.	Curva de calibración.....	36
2.2.3.6.	Ensayos con muestras.....	37
2.2.4.	Actividad antioxidante: Ensayo ABTS.....	38

2.2.4.1.	Preparación del radical ABTS <sup>•+</sup> .....	39
2.2.4.2.	Preparación de antioxidante de referencia: Trolox.....	39
2.2.4.3.	Obtención de una curva de calibración.....	39
2.2.4.4.	Recta de respuesta de Absorbancia-Concentración de Trolox.....	40
2.2.5.	Determinación de CH (Método de Dubois). ....	41
2.2.5.1.	Procedimiento.....	41
2.2.6.	Contenido en fucoidanos.....	42
2.2.6.1.	Disolución al 4% (w/v) de ác. tricloroacético.....	42
2.2.6.2.	Reactivo de cloruro de bario gelatinizado (BaCl <sub>2</sub> -gelatina) .....	42
2.2.6.3.	Solución estándar K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> que contenga 1000 µg/mL de ión SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .....	43
2.2.6.4.	Obtención de una curva de calibración de iones SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .....	43
2.2.6.5.	Hidrólisis ácida de las muestras.....	43
2.3.	Procedimiento de extracción.....	44
2.3.1.	Determinación de florotaninos mediante HPLC....	44
2.3.1.1.	Equipo.....	45
2.3.1.2.	Gradiente de elución cromatográfica y condiciones de operación instrumental .....	45
2.3.1.3.	Curva de calibración.....	46
2.4.	Ensayo de actividad metabólica (MTT) .....	48
2.5.	Análisis de viabilidad celular con resazurina.....	49
2.5.1.	Protocolo experimental .....	49



2.6. Determinación de nitritos (Test de Griess) .....	50
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>4. INFLUENCIA DE FACTORES OPERACIONALES.....</b>	<b>57</b>
4.1. Introducción .....	57
4.2. Metodología .....	57
4.2.1. Obtención de extractos y fracciones. Extracción con acetona.....	58
4.2.1.1. Extracción.....	58
4.2.2. Fraccionamiento mediante cromatografía en gel de Amberlite XAD-16.....	60
4.3. Resultados.....	65
4.3.1. Actividad antioxidante mediante método DPPH...67	
4.3.1.1. <i>Fucus vesiculosus</i> .....	67
4.4. <i>Bifurcaria bifurcata</i> .....	73
<b>5. FRACCIONAMIENTO DE FLOROTANINOS .....</b>	<b>77</b>
5.1. Introducción .....	77
5.1.1. Fraccionamiento mediante cromatografía semi-preparativa.....	79
5.1.2. Determinación de contenido fenólico total.....	81
5.1.3. Análisis estructural mediante HPLC-MS y HPLC-DAD.....	82
5.1.4. Resultados.....	84
5.2. Obtención de extractos y fracciones de florotaninos de BB mediante extracción acuosa. ....	98

5.2.1.	Preparación del extracto.....	98
5.2.2.	Extracción asistida por ultrasonido .....	98
5.2.3.	Separación cromatográfica mediante RP-HPLC .	100
5.2.4.	Resultados .....	101
<b>6.</b>	<b>FUCOIDANOS .....</b>	<b>107</b>
6.1.	Introducción .....	107
6.2.	Extracción de fucoidano crudo.....	108
6.3.	Fraccionamiento de los fucoidanos .....	110
6.4.	Contenido en carbohidratos.....	112
6.5.	Contenido en carbono orgánico total (TOC).....	114
6.6.	Contenido en sulfato .....	115
6.7.	Contenido en sulfuro y sodio .....	115
6.8.	Análisis estructural por espectrometría de masas .....	116
6.8.1.	Preparación de las muestras .....	116
6.9.	Espectrometría de masas .....	117
6.9.1.	Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	117
6.9.2.	Espectrometría de masas ESI.....	118
6.10.	Resultados .....	118
6.10.1.	Rendimiento de la extracción .....	118
6.10.2.	Perfil cromatográfico de los fucoidanos sulfatados	118
6.10.3.	Contenido en carbohidratos (CH) .....	119
6.10.4.	Contenido en carbono orgánico total (TOC)....	119
6.10.5.	Grado de sulfatación.....	120

6.10.6.	Análisis elemental.....	123
6.10.7.	Análisis por espectrometría de masas .....	124

## **7. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD..... 127**

7.1.	Actividad citotóxica.....	127
7.2.	Métodos de validación de compuestos naturales .....	128
7.3.	Evaluación de la actividad citotóxica .....	129
7.4.	Línea celular murina .....	129
7.4.1.	Preparación del medio .....	130
7.4.2.	Mantenimiento de los cultivos celulares .....	130
7.4.3.	Tratamientos.....	131
7.4.4.	Ensayo MTT.....	133
7.4.5.	Análisis estadístico .....	135
7.4.6.	Resultados.....	135
7.4.6.1.	Efecto de las fracciones F9, F14 y F32 y F37 sobre la vitalidad de las ATDC5.....	135
7.4.6.2.	Efecto del tratamiento con las fracciones F2 y F3 sobre la viabilidad celular de las células ATDC5. ....	139
7.5.	Línea celular humana de mieloma múltiple.....	142
7.5.1.	Introducción.....	142
7.5.2.	Preparación del medio .....	142
7.5.3.	Mantenimiento de los cultivos celulares .....	142
7.5.4.	Tratamientos .....	143
7.5.5.	Ensayo MTT.....	143
7.5.6.	Análisis estadístico .....	144

7.5.7.	Resultados .....	144
7.6.	Línea celular de macrófagos murinos .....	146
7.6.1.	Preparación del medio.....	147
7.6.2.	Test Alarm Blue.....	147
7.6.2.1.	Siembra de las células.....	147
7.6.2.2.	Tratamientos .....	148
7.6.2.3.	Test de vitalidad.....	148
7.6.3.	Inhibición de la producción de nitritos .....	148
7.6.3.1.	Siembra de las células.....	148
7.6.3.2.	Tratamientos .....	148
7.6.3.3.	Ensayo .....	149
7.6.4.	Resultados .....	149
7.6.4.1.	Test de vitalidad.....	149
7.6.4.2.	Inhibición de la producción de óxido nítrico	150
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>	<b>153</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>159</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura del floroglucinol. Imagen adaptada de Catarino et al. 2017. ....	10
Figura 1.2 Número de publicaciones dedicadas a florotaninos entre los años 1980 hasta el año 2010. ....	12
Figura 1.3 Trifucol formado por la unión de 3 unidades de floroglucinol a través de enlaces fenilo. Imagen extraída de la publicación de Martínez y Castañeda 2013. ....	13
Figura 1.4. Tetrafloretol A. Imagen adaptada de Martínez y Castañeda 2013. ....	13
Figura 1.5. Bifuhalol en el que se muestra el grupo hidroxilo adicional. Imagen adaptada de Martínez y Castañeda 2013. ....	14
Figura 1.6. Hidroxifuhalol B. Imagen adaptada de Martínez y Castañeda 2013. ....	14
Figura 1.7. Esquema que muestra las uniones entre unidades de $\alpha$ -L-Fucosa. Imagen adaptada de Cunha et al., 2016. ....	15
Figura 1.8. Número de artículos publicados entre los años 1980 y el 2013 (Ustyuzhaninan et al.2014). ....	17
Figura 1.9. Constituyentes de la cadena polimérica de alginato. Imagen adaptada de Nagaoka et al., 2000. ....	18
Figura 1.10. Macroalga <i>Bifurcaria bifurcata</i> . Base de datos AlgaeBase. ....	25
Figura 1.11. <i>Fucus vesiculosus</i> . Imagen extraída de la base de datos OBIS (Ocean Biogeographic Information System). ....	26

Figura 1.12. Imagen de las frondes de <i>Fucus vesiculosus</i> con los neumatocistos dispuestos de forma irregular. Imagen adaptada de Garbary et al 2016. ....	27
Figura 2.1 Recta de calibrado con floroglucinol. ....	32
Figura 2.2 Curva de calibración del complejo $F^{2+}$ con TPTZ. ....	37
Figura 2.3 Recta de calibrado. ....	40
Figura 2.4 Curva de calibración de carbohidratos totales.....	41
Figura 2.5 Recta de calibrado. ....	44
Figura 2.6 Cromatograma del estándar del floroglucinol y del resorcinol. ....	47
Figura 2.7 Curva de calibración del estándar de floroglucinol (400 mg/mL). ....	48
Figura 2.8 Curva de calibración del estándar de resorcinol (400 mg/mL). ....	48
Figura 2.9 Formación de cristales de formazán a partir de MTT. ...	49
Figura 2.10 Reacción de Griess. ....	51
Figura 4.1 Obtención de florotaninos para su estudio por diferentes ensayos. ....	57
Figura 4.2. Frasco y matraz con extracto. ....	60
Figura 4.3 Montaje utilizado para separar fracciones por cromatografía en gel .....	62
Figura 4.4. Colector y tubos con fracciones de BB en su interior. ...	63
Figura 4.5. Fracciones concentradas en el rotavapor. ....	63
Figura 4.6. Liofilizador (Telstar LyoQuest-55). ....	64
Figura 4.7 Secado de <i>Fucus vesiculosus</i> a 35 °C. ....	65

Figura 4.8 Secado de <i>Fucus vesiculosus</i> a 75 °C.....	66
Figura 4.9 Perfil de elución de la fracción polimérica BB5. ....	67
Figura 4.10. Inhibición de DPPH de extracto acuoso de <i>Fucus vesiculosus</i> secado a 35 °C (a, b) y 75 °C (c y d), partiendo de 500 mg de liofilizado/L y diversas diluciones. Interpolación para obtener EC <sub>50</sub> (e, f) a partir de la relación de dilución.....	68
Figura 4.11 Inhibición de DPPH fracciones F1 y F2 de <i>Bifurcaria bifurcata</i> secada a 35 °C (a,b), evolución y estimación de diluciones para alcanzar el IC <sub>50</sub> de la Fracción 1 (c) y Fracción 2 (d).....	73
Figura 4.12 Evolución de la absorbancia de DPPH con el tiempo provocada por la fracción obtenida a partir de <i>Bifurcaria bifurcata</i> estandarizada a 50 mg liofilizado/L.....	74
Figura 4.13 Rendimiento en polifenoles de las fracciones obtenidas de <i>Fucus vesiculosus</i> y <i>Bifurcaria bifurcata</i> tras secado a 35 °C por gramo de material liofilizado.....	75
Figura 5.1 Tubos de ensayo con polifenoles (izquierda) y tubo control (derecha). ....	82
Figura 5.2. Cromatograma de las fracciones fenólicas de <i>Bifurcaria bifurcata</i> detectados a 266 nm mediante RP-HPLC.....	85
Figura 5.3 Cromatograma de iones total (TIC) de la fracción F14 mostrando un patrón de fragmentación de un tetramero identificado como fuhalol. ....	87
Figura 5.4. Esquema del patrón de fragmentación del tetrafuhalol B (C <sub>24</sub> H <sub>14</sub> O <sub>18</sub> ) descrito por Ganard & Gomblitz (1986) mostrando la distribución de los fragmentos de masa obtenidos por HPLC-ESI-MS así como la abundancia obtenida de la fracción F14. ....	88
Figura 5.5. Estructura 3D optimizada mediante el software Chems sketch. ....	89

Figura 5.6. Perfil obtenido para la F32 cuyo m/z corresponde a 629 m/z. ....	90
Figura 5.7. Perfil obtenido de la fracción F37 con un peso molecular de 922 m/z.....	91
Figura 5.8. Cromatograma de la fracción F32 a una longitud de onda de 266 nm. ....	92
Figura 5.9 Cromatograma de la fracción F37 a una longitud de onda de 266 nm. ....	93
Figura 5.10. Espectro UV de un pico desconocido en la fracción F32 a t=25,9 minutos. ....	94
Figura 5.11. Espectro UV de un pico desconocido de la fracción F37 a t=29,9 min. ....	94
Figura 5.12. Espectro UV de un componente florotanino minoritario en la fracción F32 (pico a t=27,1 minutos).....	95
Figura 5.13. Espectro UV de un componente florotanino minoritario en la fracción F37 (Pico a t= 30,9 minutos) ....	95
Figura 5.14. Espectro UV de un componente florotanino mayoritario en F32 (Pico a 32,8 minutos).....	96
Figura 5.15. Espectro UV de un componente florotanino mayoritario en F37 (Pico a t= 32,8 minutos). ....	96
Figura 5.16 Espectro UV de la 1,4-Benzoquinona en iso-octano(1), ciclohexano(2), 1,4dioxano(3) y cloroformo(4).(Ahmed y Khan, 2000).....	97
Figura 5.17. Extracción acuosa asistida por ultrasonidos del extracto de BB. ....	99
Figura 5.18. Extracto acuoso de BB tras filtrar por membranas amicon de 0.22 micras. ....	100



Figura 5.19. Perfil cromatográfico de las fracciones F2 (izquierda) y F3 (derecha).....	102
Figura 5.20 Espectro MS-MS de la fracción F3 en el tiempo t=19,97 min. ....	103
Figura 5.21 MS-MS de la fracción F3 en el tiempo t= 21,28 min. ....	104
Figura 5.22 Espectro HPLC-DAD de la fracción F2. ....	105
Figura 5.23 Espectro de la fracción F3. ....	105
Figura 6.1 Extracción de fucoidano crudo en autoclave. ....	108
Figura 6.2. Precipitación de los alginatos durante la extracción del fucoidano. ....	109
Figura 6.3. Fucoidano crudo obtenido tras el secado a 45 °C en la estufa de vacío. ....	110
Figura 6.4. Columna de DEAE-Sepharosa (CL6B) utilizada para llevar a cabo el fraccionamiento del fucoidano crudo. ....	112
Figura 6.5. Determinación de carbohidratos por el método de Dubois. La intensidad de color de los tubos (izquierda) es indicativo de un mayor contenido en carbohidratos. ....	113
Figura 6.6 Tubos cuyo contenido en CH se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 485 nm . NaCl (0,5; 1,0 y 1,5 M): concentraciones utilizadas para llevar a cabo la elución de los carbohidratos. ....	113
Figura 6.7 MALDI-TOF modo ión negativo de un oligosacárido sulfatado obtenido por autohidrólisis de fracciones de fucoidano (F1). ....	124
Figura 7.1. Interior de una cabina de flujo laminar. ....	132
Figura 7.2. Vitalidad de las células ATDC5 después del tratamiento con F9 y F14 a diferentes concentraciones (μM). *Diferencias	

significativas respecto al control ( $p < 0.05$ ). CON: control, FBS: control de FBS. .... 136

Figura 7.3. Vitalidad de las células ATDC5 tras 48 horas de tratamiento con las fracciones F9 y F14 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). \*Diferencias significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ). CON: control, FBS: control de FBS. .... 137

Figura 7.4. Vitalidad de las células ATDC5 tras 24 horas de tratamiento con las fracciones F32 y F37 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). CON: control, FBS: control de FBS..... 138

Figura 7.5. Vitalidad de las células ATDC5 tras 48 horas de tratamiento con las fracciones F32 y F37 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). \*\*  $p < 0,01$  CON: control, FBS: control de FBS. .... 139

Figura 7.6. Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ATDC5 tras 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (1, 0,5, 0,25, 0,1) y F3 (1, 0,5).. \* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$  C: Control, FBS: Control de FBS. .... 140

Figura 7.7. Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ATDC5 tras 48 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (1, 0,5, 0,25, 0,1) y F3 (1, 0,5). \* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,05$  C: Control, FBS: Control de FBS. .... 141

Figura 7.8. Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ARH77 tras 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (50, 10, 1, 0,5 y 0,1) y F3(1, 0,5). \*  $p < 0,05$  C:CONTROL, FBS: control de FBS..... 145

Figura 7.9 Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ARH77 tras 48 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (50, 10, 1, 0,5 y 0,1) y F3 (1, 0,5). \*  $p < 0,01$ . CON: control, FBS: control de FBS..... 146

Figura 7.10. Vitalidad de los macrófagos RAW 264.7 después del tratamiento con diferentes concentraciones de las fracciones F2 y F3.

..... 150

Figura 7.11 Células RAW 267.4 después del tratamiento con F2 y F3 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). Los resultados representan un experimento con 2 observaciones. \* C:Control, LPS:

lipopolisacárido de bacteria gram -, F2 y F3 fracciones..... 151



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Hidrocoloides obtenidos de macroalgas (Rhein-Knudsen et al. 2015). .....	19
Tabla 2-1 Gradiente de elución empleado para llevar a cabo la elución cromatográfica. ....	45
Tabla 4-1 Contenido en polifenoles de extractos acuosos de <i>Fucus vesiculosus</i> y actividad antioxidante como captación de radical DPPH. *n.d.: no determinado, a 500 mg eq. de floroglucinol/L no se llegó al 50% de inhibición de DPPH; R: N° de réplica completa SD: desviación estándar. ....	69
Tabla 4-2 Capacidad reductora de las muestras a partir de los resultados del .....	70
Tabla 4-3 Capacidad reductora de las muestras a partir de los resultados del ensayo ABTS, estandarizadas a 500 mg/L de liofilizado. ....	70
Tabla 4-4 Contenido en polifenoles totales (PT) de extractos acuosos de <i>Bifurcaria bifurcata</i> , actividad antioxidante como captación de radical DPPH y valores de FRAP y TEAC a 500 mM. ....	74
Tabla 5-1. Concentración ( $\mu\text{M}$ ) de las fracciones F9 (t=9 min), F14 (t= 14 min), F32 (t=32 min) y F37 (t= 37 min) recolectadas en los runs 51-58. ....	80
Tabla 5-2. Volumen total obtenido de cada una de las fracciones (volumen inicial), el volumen después de concentrar en el rotavapor (volumen final) así como la concentración final ( $\mu\text{M}$ ) recalculada para cada una de las fracciones. ....	81
Tabla 5-3 Contenido total de polifenoles de la fracción polimérica BB5. EPG: Equivalentes en floroglucinol. ....	84

Tabla 5-4 Fragmentos comunes a todas las fracciones obtenidas por HPLC-MS con fragmentación en modo ión positivo. En negrita se muestran los fragmentos mayoritarios.....	86
Tabla 5-5 Concentración y mg recuperados de las fracciones F2 y F3. *Concentración(uM) calculada a partir de equivalentes de floroglucinol. ....	102
Tabla 6-1 Tabla que muestra el contenido en carbohidratos, los volúmenes de elución, así como el volumen y la cantidad recuperada de cada fracción. ....	120
Tabla 6-2 Contenido en Carbono Total (CT), Carbono Inorgánico (CI) y el Carbono Orgánico Total (TOC) de las fracciones de fucoidano. Los valores representan la media con la desviación estándar (SD) de las medidas en triplicado. ....	121
Tabla 6-3 Contenido en sulfatos, S, relación TOC/S y relación Fucosa/sulfato de las diferentes fracciones de fucoidano.....	122
Tabla 6-4 Contenido en sulfatos, S, relación TOC/S y Fucosa/sulfato de las fracciones F1, F2, F3, F4 Y F9 tras la diálisis y depolimerización .....	123
Tabla 6-5 Contenido en Sulfuro y Sodio de las fracciones seleccionadas. Na(mg/L) y S(mg/L): Concentración de sodio y sulfuro antes de dializar y depolimerizar. *Na(mg/L) y *S(mg/L): Concentración de sodio y sulfuro después de dializar y depolimerizar. ....	124
Tabla 6-6 Fragmentos de masas obtenidos mediante ESI-MS..	125
Tabla 7-1 Fracciones testadas y concentraciones de partida (μM)	132
Tabla 7-2. Fracciones y concentraciones testadas (μM) o tratamientos utilizados en el ensayo MTT.....	133

Tabla 7-3. Concentraciones testadas ( $\mu\text{M}$ ) de las fracciones F2 y F3.  
..... 143



## GLOSARIO

ABTS: Sal diamónica de 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Ac: Acuoso

Ác.: Ácido

Abs<sub>i</sub>: Absorbancia inicial

Abs<sub>f</sub>: Absorbancia final

ANOVA: Análisis de varianza

BB: *Bifurcaria bifurcata*

CAET: Capacidad antioxidante equivalentes Trolox

CON: Control

CH: Carbohidratos

C18: Carbono 18.

DAD: Detector diodo array

DE: Desviación estándar.

DHB: ácido 2,5-dihidroxibenzoico

d.i: Diámetro interno

DPPH: 2,2-difenil-1-picrihidrazilo

EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>: Concentración que reduce el 50% de radicales DPPH.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPG: Equivalentes en floroglucinol

ESI: Ionización por “electrospray”

FBS: Suero bovino fetal

F: Fracción

FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

IC: Carbono inorgánico

FV: *Fucus vesiculosus*

LPS: Lipopolisacárido de bacterias gram negativas.

MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz

mg eq floroglucinol: Miligramos equivalentes de floroglucinol

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2-5 difeniltetrazolio

MS: Espectrometría de masas

MWCO: “Molecular weight cut off”

m/z: Masa/carga

P96: Placas de 96 pocillos.

SEM: Desviación estándar de la media.

SDS: Docecil sulfato de sodio

TFA: Ácido trifluoroacético

TIC: Cromatograma de iones totales

TC: Carbono total

TOC: Carbono orgánico total



Tris: Trisaminometano

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-S-triazina

TOF: Time of flight

UV-vis: Ultravioleta visible

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana







# **1. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MACROALGAS COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Las macroalgas son organismos autótrofos dotados de pigmentos celulares que les permiten desarrollarse en el medio marino a diferentes profundidades. Como el resto de los organismos fotosintéticos, están en continua exposición a la luz solar y al oxígeno lo cual deriva en la formación de radicales libres. La continua exposición a dichos factores debería ocasionar un evidente deterioro en estos organismos debido a la oxidación. Sin embargo, la ausencia de daños en sus paredes celulares hace pensar que las macroalgas deben poseer unos mecanismos de adaptación que les permiten proteger sus estructuras frente a situaciones adversas. Dichos mecanismos de adaptación se explicarían con la formación de compuestos bioactivos como los antioxidantes que ejercen su actividad neutralizando a los radicales libres y previniendo así la oxidación.

Se define como compuesto bioactivo a aquel compuesto que tiene algún efecto biológico dentro del organismo. Cabe destacar que las especies de algas pertenecientes a las familias *Sargassaceae* y *Dictyotaceae* son las principales productoras de compuestos bioactivos llegando representar 2/3 de los metabolitos secundarios descritos en las algas pardas (Alves et al. 2016).

Por todo ello, las algas marinas han sido objeto de estudio en numerosos campos, los cuales han encontrado en ellas una fuente de compuestos naturales con múltiples aplicaciones.

### 1.1.1. Antecedentes

Desde la antigüedad, las macroalgas han formado parte de la alimentación de países asiáticos. Los primeros casos registrados de

fitocultura de macroalgas datan del año 1700 en la Bahía de Tokio (Lee 2008)

El alto contenido en vitaminas, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados (Spavieri et al. 2010), minerales, proteínas, bajo contenido en lípidos (Alves et al. 2016), fibra, así como el alto contenido en compuestos bioactivos ha convertido a las macroalgas en un alimento saludable con un gran valor nutritivo.

El perfil vitamínico característico de las macroalgas es superior al observable en otros alimentos por lo que se consideran una fuente importante de vitaminas.

En cuanto a la fibra de los polisacáridos algales, se le han atribuido propiedades como su actividad inhibitoria de la inflamación de la mucosa del estómago y la prevención de úlceras gastrointestinales (Rajapakse y Kim 2011).

En relación con el contenido en minerales, las macroalgas se consideran una importante fuente de minerales debido a su capacidad de absorber sustancias inorgánicas del medio, la cual viene dada por la presencia de diferentes polisacáridos en la pared celular de las algas como el ácido algínico y el alginato. De entre todos los minerales, el yodo obtenido a partir de las macroalgas como *Laminaria* ha sido uno de los minerales más valorados gracias a su contribución en el tratamiento de la gota (Mišurcová 2011).

En cuanto al contenido en proteínas, destacan sobre todas las macroalgas las algas rojas. Su contenido en proteína es comparable al presente en otros vegetales superiores (Murata et al. 2001). El cómputo aminoacídico determina la calidad de la proteína, y en el caso de las algas rojas supone entre el 60-100 %, valor superior al presente en otros organismos vegetales como los cereales. En algunos casos como en el alga “wakame” iguala al presente en proteínas de origen animal (Murata y Nakazoe 2001).

También cabe mencionar el bajo contenido en lípidos cuyo porcentaje ronda el 1-2% en peso seco (Darcy-Vrillon 1993).

A lo largo de las décadas ha aumentado el interés por dichas macroalgas debido a la multitud de aplicaciones en diferentes campos.

### **1.1.2. Aplicaciones de las algas en la industria**

La primera aplicación industrial de las algas ocurrió en Francia en el siglo XVII donde las algas pardas se utilizaban como fuente de potasio. Para ello, las algas se sometían a un proceso de secado y posteriormente se quemaban obteniendo unas cenizas denominadas “kelp”. Ésta industria se expandió llegando al Reino Unido y hacia 1720 la producción de “kelp” en Escocia alcanzaba unas 20.000 toneladas al año. Esta industria llegó a su fin a comienzos del siglo XIX con la utilización de la sosa como fuente de potasio. A pesar de ello, las macroalgas consiguieron recobrar la importancia que merecían. Hacia 1811, surgió en Europa y en Japón una industria dedicada a la extracción de yodo. Sin embargo, con el avance de las tecnologías, aparecieron otras fuentes más baratas que las macroalgas para llevar a cabo la extracción de yodo (González et al. 1998).

### **1.1.3. Las algas y la industria cosmética**

En los últimos años, la industria cosmética se ha tenido que adaptar a las exigencias de los consumidores quienes demandan cada vez más cosméticos cuyas formulaciones se basen en compuestos naturales. Dichos compuestos naturales pueden obtenerse directamente de las algas recolectadas del mar o bien a partir de algas cultivadas en las propias costas siendo las algas marrones las algas más cultivadas. Los compuestos naturales pueden ser o bien componentes de las propias algas (polisacáridos integrantes de la pared celular) o bien metabolitos secundarios originados por las algas durante su desarrollo. Uno de los compuestos más utilizados en la industria cosmética son los alginatos debido a su capacidad de estabilizar las emulsiones. Existen otros compuestos como los carotenoides, entre ellos la astaxantina, conocida por sus propiedades antioxidantes cuya acción más destacable sobre la piel se basa en suprimir la pigmentación. También existen otros carotenoides, como la fucoxantina presente en los cloroplastos de las algas marrones dotados de la capacidad de contrarrestar los daños causados por el estrés oxidativo (Wang et al. 2015). Tanto las algas pardas como las algas rojas se han utilizado ampliamente en la industria cosmética debido a su contenido en vitaminas, minerales, aminoácidos, lípidos y

otros metabolitos secundarios originados por las algas durante su desarrollo. Entre los productos derivados de las macroalgas cabe destacar cremas antiedad, lociones solares y productos capilares, entre otros. Un ejemplo es el extracto de *Fucus vesiculosus* utilizado por su propiedad atenuante de las manchas de la piel. A pesar de la amplia gama de productos derivados de las algas, aún hay poca base empírica sobre los compuestos responsables de cada actividad biológica, desconociendo si se trata de un solo compuesto o si por el contrario la actividad se debe a la acción conjunta de varios de ellos (Ariede et al. 2017).

#### **1.1.4. Las algas en la industria alimentaria**

Los países asiáticos son los principales consumidores de algas, quienes las utilizan como platos principales o como condimento de ensaladas u otros platos. Especies como *Laminaria*, *Porfiria* y *Ulva* han sido ampliamente utilizadas en la cocina asiática entre otras muchas como “nori”, “wakame” o la lechuga de mar. Dichas algas contienen aminoácidos o elementos que las hacen atractivas para uso culinario. Un ejemplo de ello es el glutamato monosódico presente en algas como “kombu”, el cual confiere a los platos un sabor característico. El alto contenido de otros elementos, como por ejemplo el potasio presente en *Laminaria* se ha aprovechado como sustituto del sodio (Rioux et al. 2017).

Otros usos frecuentes a nivel alimentario son como espesantes, estabilizadores, así como en platos precocinados y postres.

También, debido a su contenido en minerales, entre los que destacan el hierro, las macroalgas han sido utilizadas como nutraceuticos. El alto contenido en minerales junto con el contenido de metabolitos secundarios, vitaminas, polisacáridos y otros compuestos presentes en las macroalgas ha hecho que la industria nutraceutica considere a las macroalgas una fuente de compuestos de alto valor nutricional y terapeutico (Suleria et al. 2015). Se entiende como nutraceutico un compuesto cuya acción tiene valor nutricional y un valor farmacéutico añadido. A diferencia de los alimentos funcionales de los que se hablará a continuación, un nutraceutico debe ser utilizado con el objetivo de mejorar algún problema de salud. En



cambio, los alimentos funcionales, entre los cuales también destaca el uso de macroalgas, se caracterizan por ser alimentos que además de tener un valor nutricional pueden prevenir la aparición de ciertas enfermedades. El término de alimento funcional nació en Japón a comienzos de los años 80 debido a la necesidad de investigar acerca de alimentos con propiedades terapéuticas que pudieran paliar el gasto en salud pública de una población con una mayor esperanza de vida (Plaza et al. 2008). Muchos investigadores emplean indistintamente ambos términos, pero quizás el término más correcto es el descrito por Cencic y Chingwaru (2010) quienes denominan como alimento funcional a un alimento cuyo uso prolongado tiene beneficio en la salud, y cuando además ese beneficio tiene un uso terapéutico comprobado en la prevención o tratamiento de una enfermedad, se denomina nutraceutico.

### **1.1.5. Las algas y su papel en la medicina.**

Una de las primeras aplicaciones destacables de las algas en el ámbito médico fue su uso como medicamentos en enfermedades como el hipertiroidismo, y otras como el bocio donde su principal función fue servir de fuente de yodo (El Gamal 2010).

A lo largo de las décadas, a las macroalgas se les han atribuido más aplicaciones en el ámbito farmacéutico. Entre ellas destacan las derivadas del uso de polifenoles presentes en algunas algas pardas para el tratamiento de la diabetes o el cáncer. Estos polifenoles, denominados florotaninos, han sido aislados de algas como *Eclonia cava* y *Laminaria japonica*, demostrando actuar como agentes antidiabéticos y antitumorales. Concretamente, los florotaninos derivados del alga parda *Laminaria japonica* han presentado actividad antiproliferativa contra líneas tumorales humanas y contra líneas tumorales murinas. Como dato destacable, se piensa que la actividad antiproliferativa está asociada al contenido en polifenoles totales (Thomas y Kim 2011).

### **1.1.6. Otras aplicaciones**

En el ámbito agrícola, las algas han despertado un gran interés como fertilizantes gracias a su alto contenido en minerales,

compuestos bioactivos, etc. Desde hace décadas, los agricultores las han utilizado como fertilizantes. Las macroalgas arrastradas por el oleaje hacia la costa eran recolectadas por los agricultores que las utilizaban como abono para la fertilización de sus cultivos.

Con el paso de los años, surgió una nueva forma de disponer de dichos fertilizantes sin la necesidad de transportar grandes cantidades de macroalgas a otros lugares, en muchos casos alejados de la costa. Así, con el objetivo de reducir el coste económico que suponía transportar las macroalgas y además disponer de todos sus beneficios fertilizantes, nacieron los extractos de algas. Dicha capacidad fertilizadora se debe a las hormonas presentes en las macroalgas, las cuales actúan como estimuladoras del crecimiento de las plantas (Craigie 2011).

A pesar de su amplio uso como agentes fertilizantes, hoy en día no existen muchos estudios que detallen los beneficios sobre los atributos del suelo como por ejemplo actividad enzimática en suelos replantados (Wang et al. 2016).

Actualmente existen estudios que se basan en la utilización de las algas como bioestimulantes. Su papel se basa en ayudar a ciertas plantas como el maíz a superar periodos de estrés, u otras situaciones como la carencia de determinados nutrientes. Esta capacidad de las algas se logra gracias a la combinación de diferentes extractos de algas marinas. Hoy en día, la legislación regula la utilización de algas como fertilizantes limitando su uso.

Las macroalgas también han saltado al campo de la biorremediación dónde se utilizan para la remediación de aguas residuales. Estas aguas residuales pueden ser tanto agrícolas como aguas residuales industriales contaminadas con metales pesados. La utilización de las macroalgas se basa en su alta productividad de biomasa en comparación con las microalgas. Es importante destacar que los subproductos obtenidos han tenido múltiples aplicaciones como materia prima para fuentes de energía, carbón vegetal o biochar, elaboración de piensos de animales (Cole et al. 2015), entre otros. En este último caso, los piensos obtenidos presentan un alto contenido en proteínas y minerales idóneos para la alimentación animal. Estos subproductos se obtienen a partir de la biomasa algal obtenida al

cultivar macroalgas en aguas residuales ricas en nitrógeno y fósforo procedentes de la agricultura (Lawton et al. 2017).

En el campo de la investigación, su papel es clave en la búsqueda de compuestos con diversas actividades biológicas como son su actividad antitumoral (Moreau et al. 2006), antiinflamatorio, inmunitaria, antibacteriana (Ignat et al. 2013), antiprotozoica (Spavieri et al. 2010), antialérgica (SUGIURA et al. 2007), antioxidante (Nakai et al. 2006), entre otras.

### **1.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS MACROALGAS EN EL LITORAL**

El litoral o zona costera es la superficie delimitada entre el ecosistema terrestre y el ecosistema marino. Las algas se distribuyen a lo largo del litoral rocoso siguiendo una estratificación fruto de las diferentes necesidades de las especies, de las mareas y de la orientación del espacio considerado. Este fenómeno de estratificación se denomina zonación (González et al.1998).

#### **1.2.1. Zonación litoral**

Existen diferentes formas de explicar la distribución de las algas en las costas en función de los factores físicos o la presencia de diferentes tipos de organismos. El modelo de zonación descrito por Seoane Camba en 1969 establece áreas sometidas a factores físicos (González et al. 1998).

Zona o nivel supralitoral: es la zona del litoral más elevada, situada por encima de la costa. La zona supralitoral se caracteriza porque nunca está sumergida y sufre las influencias marinas de forma superficial. Por un lado, está influenciada por la saturación salina del aire y por otro lado es salpicada por el oleaje en días de temporal. Es una zona cuyos organismos se ven afectados por las difíciles condiciones del medio, caracterizado por presentar un sustrato pobre y falta de agua. Debido a esto, los organismos que allí habitan presentan tejidos preparados para soportar tanto la desecación derivada de la alta salinidad, así como los fuertes vientos durante el invierno. Es una zona con menor diversidad ecológica donde destaca la presencia de líquenes, pero por otro lado es una zona donde no se observa gran cantidad de especies de macroalgas. Su extensión es variable en

función de diversos factores como son el oleaje y el grado de inclinación de la costa entre otros.

Zona litoral o mesolitoral, también denominada intermareal: Es el nivel que se sitúa a continuación del nivel supralitoral y que permanece sumergido en función de las mareas. Es un ecosistema muy dinámico en el que las especies de algas que habitan tienen que estar adaptadas a los periodos de desecación ya que permanecen grandes periodos de desecación durante las mareas bajas. Se diferencian tres zonas diferentes en función del tiempo que permanecen descubiertos. Estas zonas se denominan horizontes: superior, medio e inferior y vienen dadas por las mareas. El horizonte superior es el horizonte que solo queda cubierto por las aguas durante las mareas vivas, quedando por lo tanto al descubierto la mayor parte del tiempo. El horizonte intermedio está delimitado por los valores máximos y mínimos de las mareas muertas. Por último, el horizonte inferior se caracteriza por permanecer mayor parte del tiempo inundado.

Zona o nivel infralitoral: es la zona bajo el litoral que siempre se encuentra por debajo del nivel del mar. Esta zona solo queda al descubierto ocasionalmente en las mareas máximas anuales (González et al. 1998). En esta zona del litoral el factor limitante es la luz por lo que a determinadas profundidades la presencia de algas viene dada por su capacidad de adaptarse a un ambiente de baja luminosidad.

Debido a la existencia de estas zonas litorales influenciadas por múltiples factores se establece una zonación horizontal para las especies. Dicha zonación horizontal viene determinada por la zona costera y por la influencia de múltiples factores principalmente la luz solar. La disposición de las algas en estas franjas viene dada por su capacidad de captar la luz en función de los pigmentos fotosintéticos que poseen. En el caso de las algas verdes se verán influenciadas por su capacidad de captar la luz roja. En el caso de las algas rojas, pueden habitar a mayor profundidad gracias a su capacidad de captar la luz azul que penetra a mayor profundidad. Por su parte, las algas pardas son capaces de habitar en zonas más intermedias.

### **1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS MACROALGAS O ALGAS MARINAS**

Las algas marinas se clasifican en algas verdes (*Chlorophyta*), algas rojas (*Rhodophyta*) y algas marrones (*Phaeophyta*) cuyo nombre viene designado por el tipo de pigmento característico presente en cada una de ellas.

#### **1.3.1. Las algas verdes**

Es el grupo de algas más cercano a las plantas terrestres, entre cuyas semejanzas se encuentran sus pigmentos y sustancias de reserva. Pertenecen a la División *Chlorophyta* y los pigmentos más característicos son la clorofila a y b que le confieren el tono verdoso. Son algas mayormente continentales, aunque también pueden vivir en el ecosistema marino.

#### **1.3.2. Las algas rojas**

Las algas rojas o rodofitas pertenecen a la división *Rhodophyta*. Dichas algas deben su coloración rojiza a la presencia de los pigmentos ficoeritrina y ficocianina.

#### **1.3.3. Las algas pardas**

Las algas pardas o algas marrones son algas que se caracterizan por presentar mayoritariamente pigmentos denominados fucoxantina y xantofila los cuales dotan a dichas algas del color marrón característico. Un alga parda de tonalidad verde oliva indica una menor cantidad de fucoxantina. También presentan otros pigmentos como los betacarotenos, clorofilas a y b, entre otras xantofilas. Se trata de organismos pluricelulares que pueden vivir bien ancladas al sustrato o flotando en el mar formando grandes macroalgas. De hecho, las especies de macroalgas de mayor tamaño como *Macrocystis* pertenecen a este grupo. Sus grandes dimensiones las hacen responsables de una serie de funciones en el medio marino como soportar el fuerte oleaje en el mar. Esto permite el asentamiento sobre ellas de otras especies como pueden ser erizos y moluscos. En muchos casos forman verdaderos cinturones algales propicios para el desarrollo de múltiples organismos.

Cabe destacar las múltiples actividades biológicas presentes en estas algas que abarcan desde actividad antioxidante, neutralizante de radicales libres, actividad citotóxica, antimicrobiana, antitumoral, entre otras. Muchas de las actividades mencionadas se atribuyen a los compuestos bioactivos presentes en las macroalgas pardas.

## 1.4. ALGAS PARDAS COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

### 1.4.1. Florotaninos

En los años 70 se empezaron a publicar diversos estudios sobre metabolitos presentes en las algas marrones cuyas características iniciales las agrupaban dentro de los taninos. Estos metabolitos inicialmente denominados taninos de las feofitas, posteriormente se denominaron como florotaninos (Martínez y Castañeda 2013). Por lo tanto, los florotaninos son un grupo exclusivo de polifenoles presentes únicamente en las algas pardas caracterizadas por poseer un alto contenido en florotaninos, formados a partir de monómeros de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzono) cuyos pesos moleculares van desde los 126 Da hasta los 650 kDa (Catarino et al. 2017). Entre sus funciones principales destacan formar parte de la pared celular de las algas, así como proveer a las algas de un mecanismo de defensa contra depredadores o proporcionar protección frente a la radiación UV. Debido a su alta complejidad estructural, hoy en día no hay una caracterización exhaustiva de los florotaninos derivados de las macroalgas (Heffernan et al. 2015). La Figura 1.1 muestra la estructura característica de la unidad de floroglucinol.

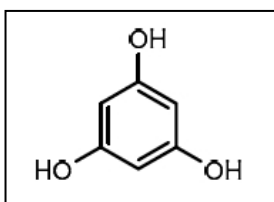


Figura 1.1 Estructura del floroglucinol. Imagen adaptada de Catarino et al. 2017.

En cuanto a su origen se postula que los florotaninos se sintetizan a través de la vía policétida o vía del acetato-malonato y la concentración de florotaninos varía en función de diversos parámetros como son la especie, el hábitat, la época de cosecha, exposición a la luz y la disponibilidad de nutrientes (Steevensz et al. 2012). Estudios previos sugieren que los florotaninos se encuentran principalmente en el citoplasma celular, en el interior de unas estructuras denominadas fisodos, y pasan a formar parte de la pared celular cuando dichos fisodos se fusionan con la pared celular-posiblemente durante el proceso de maduración de las macroalgas (Koivikko et al. 2005). Esto está en concordancia con el hecho de que las partes vegetativas más longevas presentan mayor concentración de florotaninos que los meristemos del alga (Koivikko et al. 2005).

En cuanto a su interés, los florotaninos han sido objeto de estudio durante más de 40 años debido a su potencial uso como compuestos con actividad biológica. En los últimos años las publicaciones dedicadas a florotaninos han ido en aumento (Martínez y Castañeda 2013). La Figura 1.2 muestra el aumento en el número de publicaciones de florotaninos en los últimos años. Como ya se mencionó anteriormente, debido a su complejidad estructural no existen muchas publicaciones relacionadas con la identificación de dichos compuestos polifenólicos. La mayoría de las publicaciones están relacionadas con su actividad biológica.

Se han llevado a cabo estudios sobre la actividad biológica de florotaninos de algunas algas pardas. Entre ellas, especies como *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera*, *Ecklonia kurome*, *Eisenia bicyclis*, *Ishige okamurae*, *Sargassum thunbergii*, *Hizikia fusiformis*, *Undaria pinnatifida* y *Laminaria japonica* han sido descritas como fuente de florotaninos caracterizados por presentar actividades biológicas beneficiosas para la salud. Entre dichas actividades biológicas se han reportado actividades antioxidantes, efecto inhibitorio de enzimas, actividad antibacteriana, actividad anti-VIH, actividad anticancerígena, antialérgicas y efecto radioprotectivo (Li et al. 2011).

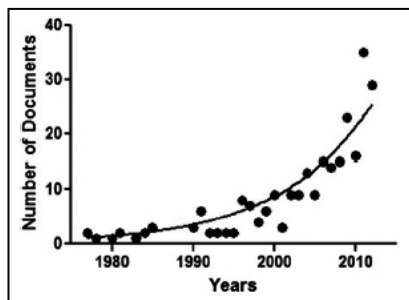


Figura 1.2 Número de publicaciones dedicadas a florotaninos entre los años 1980 hasta el año 2010.

En cuanto a su clasificación, los florotaninos se pueden clasificar de diferentes maneras en función del número de unidades de floroglucinol que contengan. Cuando se trata de florotaninos formados por un número de unidades de floroglucinol no muy extenso se pueden clasificar en base a las uniones entre las unidades de floroglucinol, pero cuando el número de unidades de floroglucinol aumenta se utilizan otros criterios distintos. De esta manera, en base a las uniones entre las unidades de floroglucinol, los florotaninos se pueden clasificar principalmente en 3 grandes grupos: fucosles (cuando se encuentran unidos por enlaces de fenilo), floretoles (cuando se trata de florotaninos unidos mediante enlaces arileter) y fucofloretoles (cuando se trata de unidades de florotaninos unidas con enlaces arileter y enlaces fenilo) (Martínez y Castañeda 2013). A continuación, se hace una descripción más extensa de cada uno de los grupos basándose en la publicación llevada a cabo por los mismos autores.

#### 1.4.1.1. Fucosles

En este grupo se encuentran los florotaninos cuyas uniones entre unidades de floroglucinol sólo se puede dar por uniones fenil, es decir entre carbono y carbono, en posición META. En la Figura 1.3 extraída de la publicación de Martínez y Castañeda 2013 se muestra un trifucol con las uniones fenil características entre unidades de floroglucinol.



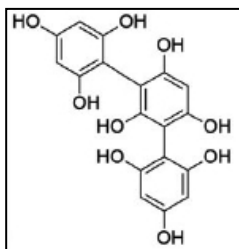


Figura 1.3 Trifucol formado por la unión de 3 unidades de floroglucinol a través de enlaces fenilo. Imagen extraída de la publicación de Martínez y Castañeda 2013.

#### 1.4.1.2. Floretoles

Se trata de florotaninos que se forman mediante enlaces aril-éter (uniones C-O-C) entre las unidades de floroglucinol. Dentro de éstos, se distinguen los floretoles lineales, que pueden tener puentes éter bifenilo orientados en posición orto, meta o para o una combinación de ellos. En la figura 4 se muestra la estructura del tetrafloretol A.

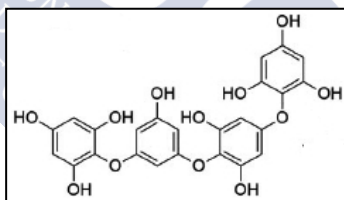


Figura 1.4. Tetrafloretol A. Imagen adaptada de Martínez y Castañeda 2013.

#### 1.4.1.3. Fuhaloles

Por otro lado, hay que mencionar otro tipo de floretoles denominados fuhaloles. Los fuhaloles presentan un grupo hidroxilo adicional en la unidad monomérica terminal. La

Figura 1.5 muestra la estructura de un bifuhalol.

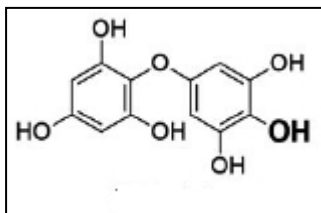


Figura 1.5. Bifufuralol en el que se muestra el grupo hidroxilo adicional. Imagen adaptada de Martínez y Castañeda 2013

#### 1.4.1.4. Hidroxifufaloles

Los fufaloles que presentan más de un grupo hidroxilo adicional se han denominado hidroxifufaloles. En la Figura 1.6 se muestra un hidroxitrifufalol B.

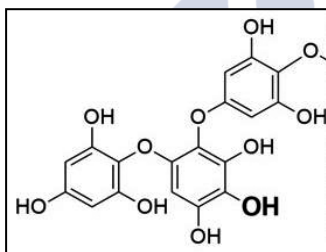


Figura 1.6. Hidroxifufuralol B. Imagen adaptada de Martínez y Castañeda 2013.

#### 1.4.1.5. Fucofloretoles

Se forman por combinaciones de uniones C-C y C-O-C dando lugar a diferentes florotaninos. Estos pueden ser lineales o formar estructuras más complejas dando lugar a florotaninos ramificados y en otros casos heterocíclicos.

### 1.4.2. Fucoidanos

Los fucoidanos son otro tipo de componente funcional de gran valor dentro de las algas pardas. Originalmente los fucoidanos aislados de las algas pardas se denominaron fucoidín y posteriormente

adquirieron el nombre de polisacáridos sulfatados que contenían fucosa. Su función como componentes de la pared celular del alga no está muy clara, aunque se cree que previenen de la desecación y proporcionan integridad estructural (Hahn et al. 2012). Los fucoidanos son polisacáridos sulfatados complejos derivados de las algas pardas pero que también se encuentran en otros organismos invertebrados marinos (Hu et al. 2016). Entre estos organismos invertebrados se encuentran el pepino marino, que se diferencia de los fucoidanos presentes en las algas pardas en que son polisacáridos lineales (Hahn et al. 2012). Estructuralmente los fucoidanos son polisacáridos altamente sulfatados compuestos por unidades de  $\alpha$ -L-fucosa cuya unión se lleva a cabo entre enlaces glicosídicos 1-3 y 1-4 y que están sulfatados en posiciones 2 y/o 3 y/o 4. La Figura 1.7 muestra unidades de  $\alpha$ -L-Fucosa unidas mediante enlaces glicosídicos 1-3 y 1-4 presentes en los fucoidanos.

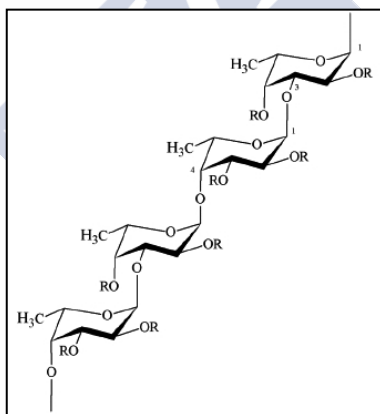


Figura 1.7. Esquema que muestra las uniones entre unidades de  $\alpha$ -L-Fucosa. Imagen adaptada de Cunha et al., 2016.

Además de los monosacáridos L-fucosa pueden contener también otros monosacáridos como galactosa, xilosa, manosa y otros monosacáridos. Todas las combinaciones posibles dan lugar a una gran diversidad de fucoidanos que se traduce en una diversidad

biológica. Es por ello que uno de los aspectos más importantes al hablar de fucoidanos es la importancia entre la estructura química y su actividad biológica. Diversos estudios han demostrado que existe una relación directa entre la estructura química del fucoidano y su actividad biológica. Diferencias en la estructura química del fucoidano pueden venir dadas por diferentes tamaños moleculares, diferente composición de monosacáridos, grado de sulfatación, así como la posición del sulfato. Todo esto se puede atribuir al tipo de especie de macroalga, al lugar de recolección, a la época del año y al contenido en polisacáridos. Pero no solo son estos los factores implicados. El modo de obtención de los fucoidanos (extracción y purificación) también está relacionado con la obtención de diferentes estructuras (Garcia-Vaquero et al. 2017).

Los fucoidanos tienen un amplio rango de actividades biológicas y la mayoría de los estudios en busca de dicha bioactividad se han llevado a cabo sobre el extracto de fucoidano crudo. Por el contrario, el número de publicaciones relacionadas con fracciones aisladas de fucoidano es minoritario y la mayoría de las veces está relacionado con los efectos del fucoidano en la coagulación de la sangre (Berteau y Mulloy 2003).

Entre las actividades biológicas de los fucoidanos cabe destacar su capacidad antioxidante (Wang et al 2008), antitumoral (Yang et al. 2008; Anastyuk et al. 2012), gastroprotector (Nagaoka et al. 2000; Shibata et al. 2000), renoprotector (Zhang et al. 2005), antiviral (Thuy et al. 2015), antibacteriano (Hideyuki Shibata et al. 2003) y antiinflamatorio (Jiang et al. 2011; Hwang et al. 2015). Además, los fucoidanos son beneficiosos como prebióticos debido a su capacidad para estimular la microbiota intestinal (Zaporozhets et al. 2014; Okolie et al. 2017; Shang et al. 2017).

La Figura 1.8 muestra el aumento en el número de publicaciones relacionadas con la actividad biológica de los fucoidanos en los últimos años.

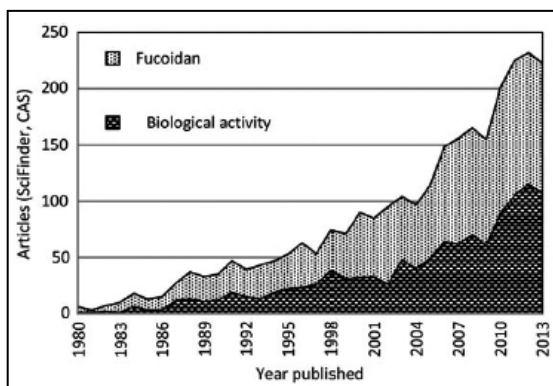


Figura 1.8. Número de artículos publicados entre los años 1980 y el 2013 (Ustyuzhaninan et al.2014).

Como ya se mencionó anteriormente, muchas actividades biológicas vienen dadas por la estructura del fucoidano. Múltiples estudios llevados a cabo con fucoidanos se han centrado en demostrarlo. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo por Jin et al. (2013) sobre la actividad anticoagulante de un grupo de fucoidanos reveló que el peso molecular promedio así como la relación molar de fucosa/galactosa fue determinante para la actividad anticoagulante de dichos fucoidanos.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de tratar de aislar fucoidano con el objetivo de buscar alguna actividad biológica es la dificultad a la hora de llevar a cabo la extracción debido a la estructura característica del fucoidano. Los fucoidanos de las algas pardas generalmente son fucoidanos altamente ramificados con un alto peso molecular, compuestos por unidades de hetero o monosacáridos con grupos sulfato que les confieren la carga negativa. Estas propiedades hacen que el proceso de extracción y purificación sea laborioso (Liu et al. 2016).

### 1.4.3. Alginatos

Los alginatos, al igual que los fucoidanos, también pertenecen al grupo de polisacáridos presentes en la pared celular de las algas. Este

tipo de polisacárido puede llegar a alcanzar el 40 % de peso seco del alga en especies como *Laminaria spp*, *Macrocystis spp*, *Ascophyllum spp*, *Sargassum spp* y *Fucus spp* (Rhein-knudsen et al. 2015). Debido a esto último, hoy en día la fuente de obtención de alginatos son principalmente las algas pardas. Cabe destacar que los alginatos son el principal componente estructural de la pared celular y de la matriz intercelular y le confieren al alga propiedades mecánicas. Su estructura se basa principalmente en una cadena polimérica constituida por ácido manurónico y ácido gulurónico (Figura 1.9) en proporciones variables. Entre las propiedades del alginato se encuentran su solubilidad, viscosidad y habilidad para intercambiar iones con los metales divalentes. Entre una de sus múltiples aplicaciones destaca su uso como agente de inmovilización celular encapsulando en su interior células microbianas, como por ejemplo el alginato extraído de macroalgas como *Macrocystis pyrifera* (Yabur, et al. 2007).

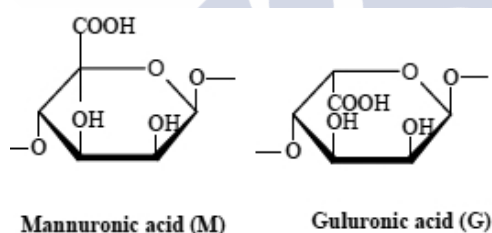


Figura 1.9. Constituyentes de la cadena polimérica de alginato. Imagen adaptada de Nagaoka et al., 2000.

Al igual que el agar y los carragenatos, este tipo de polisacárido hidrocoloide (sustancia que interactúa con el agua para formar un sistema coloide) tiene una gran importancia desde el punto de vista económico utilizándose en la industria alimentaria (espesantes) y farmacéutica (encapsulación) entre otras, debido a sus propiedades fisicoquímicas mencionadas anteriormente. Un dato destacable es el valor económico que alcanza el alginato extraído de las macroalgas junto con el agar y el carragenato, el cual se describirá más adelante.

La Tabla 1-1 muestra el mercado de los hidrocoloides entre los que destacan la producción global de alginato y de carragenato, el cual se espera que vaya en aumento (Rhein-knudsen et al. 2015).

**Tabla 1-1. Hidrocoloides obtenidos de macroalgas (Rhein-Knudsen et al. 2015).**

Producto	Producción global (toneladas/año)	Valor mercado (millones de dólares)
Agar	10.600	131
Alginato	30.000	339
Carragenato	60.000	626

#### 1.4.4. Carotenoides

Entre los carotenoides presentes en las algas pardas destaca la fucoxantina, la cual proporciona a las algas pardas un color pardo amarillento característico. La fucoxantina se aisló por primera vez a partir de las macroalgas pardas *Fucus*, *Dictyota* y *Laminaria* en 1914 (Peng et al. 2011).

Este pigmento pertenece al grupo de las xantofilas, un tipo de carotenoides que además de estar compuestos por carbono e hidrógeno contienen oxígeno en su estructura. Las fucoxantinas se utilizan tanto en la industria alimentaria como en la industria farmacéutica, así como en otro tipo de ámbitos relacionados con su actividad antioxidante y antitumoral (Roh, Uddin, and Chun 2008).

Además, se le han atribuido otras potentes bioactividades entre las que se incluyen su actividad antiinflamatoria, antidiabética, antimalárica, antiangiogénica, además de efectos protectores de órganos como el hígado, la piel y los ojos. Todo este conjunto de bioactividades se atribuyen a la estructura molecular única de la fucoxantina, diferente de otro tipo de carotenoides (Peng et al. 2011).

Como dato de interés la fucoxantina es altamente susceptible a la degradación por la luz, calor y pH (Hii et al. 2010).

## **1.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LAS ALGAS**

Entre los factores que repercuten en el desarrollo y distribución de las macroalgas cabe destacar una serie de factores ecológicos/abióticos.

### **1.5.1. Luz**

Entre todos los factores que afectan al desarrollo de las macroalgas, la luz es uno de los factores más determinantes. Las algas necesitan de la luz solar para realizar la fotosíntesis y la disponibilidad de ésta dependerá de la luz que penetre en el mar. La luz solar incide en el mar, pero sólo una parte de ella penetra, el resto se refleja.

Una vez que la luz solar penetra en el mar, en función de las partículas en suspensión y de las especies y plantas que allí se encuentran, la luz solar alcanzará diferente profundidad. Además, una vez que la luz solar penetra en el mar, se absorbe en las diferentes capas en función del tipo de luz. La luz verde es la que penetra en la superficie del mar, la luz azul-verdosa es capaz de penetrar varios metros y por último la luz verde es la que alcanza mayores profundidades. Por todo esto, la cantidad de luz que disponen las macroalgas depende de varios factores entre ellos la cantidad y el tipo de luz que alcanzara diferentes profundidades.

### **1.5.2. Temperatura**

La temperatura es un factor importante para el desarrollo de las algas ya que hay unos umbrales de temperatura donde las algas se desarrollan. Fuera de estos umbrales de temperatura la actividad vegetal se paraliza (Lefevre-Balleydier 2003).

En el último siglo el promedio de la temperatura de la superficie del mar a nivel mundial ha aumentado 0,7 °C. A lo largo de la última década la temperatura de la superficie ha ascendido a mayor velocidad (Müller et al. 2009). El aumento de las temperaturas se debe por un lado a la variación natural del clima y por otro lado a la acción del hombre. La variación natural anual produce un cambio en la temperatura de las aguas relacionado con ciertos fenómenos naturales como son la oscilación del Atlántico norte. La segunda causa del



aumento de la temperatura es la acción antropogénica debido a un aumento de los gases invernadero. Las algas se desarrollan en un rango de temperaturas que va desde los 5 hasta los 20 °C; siendo la temperatura óptima de crecimiento para muchas de las algas europeas en torno a los 15 °C (Sjötun et al. 2015). Las elevadas temperaturas junto a la deficiencia de nutrientes han provocado la disminución de las tasas de crecimiento y de reproducción de muchas macroalgas. En las situaciones más desfavorables incluso ha aumentado su mortalidad disminuyendo por tanto la diversidad de las especies (Díez et al. 2012). Debido a esto hay que destacar un fenómeno que se está produciendo en las costas británicas e irlandesas donde especies de macroalgas están desplazándose hacia el Norte debido a este incremento de temperaturas. En el caso de macroalgas pardas se observan desplazamientos de algas como *Bifurcaria bifurcata* (Hiscock et al. 2004). Hoy en día, es un hecho que el aumento de la temperatura de los ecosistemas acuáticos está provocando una disminución en las praderas de macroalgas de todo el mundo. Cabe destacar el caso de la bahía Shark, una de las mayores praderas de pastos marinos situada en Australia occidental. Estudios llevados a cabo en dicha bahía han concluido que las altas temperaturas registradas en los últimos años han provocado el descenso de las especies que allí habitan. Este hecho es alarmante debido a la importancia que tienen especies como las macroalgas en la captación de carbono, el cual se puede liberar en forma de CO<sub>2</sub> una vez que las macroalgas se descomponen. Por desgracia, actualmente no existen estudios que evalúen los impactos negativos debidas a la degradación de dichos ecosistemas de pastos marinos.

### 1.5.3. Nutrientes

Entre las sales nutritivas más importantes para el desarrollo de las macroalgas se encuentran el nitrógeno y el fósforo. Su presencia en el mar muchas veces viene determinada por su cercanía a ríos o ascensos de aguas profundas que contengan grandes cantidades de estos elementos necesarios para el desarrollo de las algas (Lefèvre-Balleydier 2003).

Estudios llevados a cabo en los últimos años han descrito comunidades de algas que a pesar de estar bajo la influencia de altas temperaturas alcanzaron un gran desarrollo por encontrarse en zonas con alta disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, se puede considerar a los nutrientes una especie de antagonista del efecto derivado de las altas temperaturas (Endo et al. 2017) .

La disponibilidad del nitrógeno es un factor clave en la producción de enzimas en las macroalgas pardas. Su limitación afecta negativamente a la tasa de fotosíntesis y al desarrollo de las macroalgas (Nygård y Dring 2008).

#### **1.5.4. Salinidad**

La salinidad es otro de los factores que afectan a las tasas de crecimiento de las algas.

La salinidad es un indicador del nivel de sales inorgánicas presentes en el mar y determina la presión osmótica del agua marina. En función de dicha presión osmótica, las macroalgas llevan a cabo la absorción de nutrientes y la regulación de humedad dentro y fuera de la membrana semipermeable. Condiciones de alta salinidad normalmente provocan una disminución en la tasa de crecimiento de las macroalgas como en el caso de la macroalga *Hypnea Cervicornis* (Ding et al. 2013)

Un claro ejemplo de ello es el caso de los estuarios donde se predice que la salinidad disminuirá debido a la inclusión de aguas procedentes de las precipitaciones provocando el desplazamiento de las poblaciones de macroalgas que allí habitan y la inclusión de otras algas más tolerantes a estas variaciones (Sjötun et al. 2015).

#### **1.5.5. Oxígeno**

La presencia de oxígeno en el mar depende de la captación del oxígeno de la atmósfera y de la producción de oxígeno en el medio marino a través de la fotosíntesis. Se conoce que el nivel de oxígeno en las capas superficiales del mar es mayor que en capas más profundas y depende de factores como la temperatura del mar, la salinidad y la cantidad de materia orgánica en descomposición.

La baja solubilidad del oxígeno en el mar, en comparación con solubilidad del oxígeno en la atmósfera, conlleva una menor disponibilidad de oxígeno. Esta situación puede darse incluso en situaciones en las que existe un equilibrio en la difusión del oxígeno con la atmósfera (Caraco et al. 2006). El bajo contenido en oxígeno tiene a su vez consecuencias en la disponibilidad de nutrientes y conlleva por lo tanto cambios en el medio marino.

Por lo tanto, todas estas pueden afectar al desarrollo de los organismos que habitan el medio marino, entre ellas las macroalgas.

### **1.5.6. Exposición al oleaje**

El oleaje es uno de los factores que afectan a la disposición de los nutrientes en los mares. El oleaje provoca el movimiento de los nutrientes que están en el mar, así como los gases disueltos en el agua. Por otro lado, en ocasiones los oleajes son demasiado fuertes llegando a provocar el deterioro y en muchos casos la pérdida de estructuras que forman parte de las macroalgas como pueden ser las ramas principales y/o secundarias. Por lo tanto, en zonas sometidas a un gran oleaje se espera que las condiciones para el desarrollo de las macroalgas sean más desfavorables que en un ambiente con menor oleaje y por lo tanto más propicio para el crecimiento y desarrollo de las macroalgas.

## **1.6. ESPECIES BAJO ESTUDIO**

### **1.6.1. *Bifurcaria bifurcata***

#### **1.6.1.1. Clasificación**

*Bifurcaria bifurcata* es un alga perteneciente a la familia *Sargassaceae*, orden *Fucales*, clase *Phaeophyceae* (Base de datos AlgaeBase).

#### **1.6.1.2. Distribución y hábitat**

Se trata de una macroalga parda presente en la costa atlántica cuya distribución abarca desde el Sur de Marruecos hasta el Noroeste de Irlanda.

Su hábitat se encuentra en la zona supralitoral y en la zona intermareal media.

Puede llegar a formar auténticas praderas que son observables cuando baja la marea.

#### 1.6.1.3. Morfología

Es un alga de coloración pardo-amarillenta que adquiere un color negruzco cuando se somete a condiciones de desecación. Está constituida por un talo cilíndrico de sección circular de unos 3 mm de grosor del que parten varios ejes principales. Su longitud alcanza unos hasta los 30 cm aproximadamente y se fija al sustrato por medio de un eje rastrero que se adhiere al sustrato por pequeños discos de fijación. Los ejes principales se ramifican desde la mitad del talo principal dándole esa apariencia dicotómica (Figura 1.10). Este tipo de ramificación irregular proporciona al alga de un aspecto característico en forma de zigzag (González et al. 1998).

#### 1.6.1.4. Ciclo de vida

En cuanto a su ciclo de vida se trata de una especie hermafrodita, cuyo periodo de reproducción abarca desde abril a octubre. En ese periodo se pueden distinguir en las frondes unas pequeñas aberturas a modo de puntos oscuros denominados ostiolas. La función de los ostiolas es liberar los gametos una vez que los receptáculos estén maduros.

La apariencia de los receptáculos es cilíndrica y alargada y presentan múltiples conceptáculos (página web Seaweed). Dichos receptáculos se desarrollan en los extremos de los talos cuando llega la primavera y están provistos de múltiples conceptáculos. Rara vez presentan vesículas de aire en la base de los receptáculos.

En cuanto a su longevidad puede alcanzar más de 10 años, aunque es una especie perenne.



Figura 1.10. Macroalga *Bifurcaria bifurcata*. Base de datos AlgaeBase.

### **1.6.2. *Fucus vesiculosus***

#### **1.6.2.1. Clasificación**

*Fucus vesiculosus* Linnaeus es una macroalga perteneciente a la familia *Fucaceae*, orden *Fucales*, clase *Phaeophyceae* (base de datos AlgaeBase).

#### **1.6.2.2. Distribución y hábitat**

*Fucus vesiculosus* L. es un alga parda que se distribuye ampliamente por las costas atlánticas de Europa, el Mar Báltico, el Norte de Rusia, Groenlandia, las islas Azores, las Islas Canarias y las costas del océano Pacífico (Pozharitskaya et al. 2018). Su hábitat comprende las costas rocosas del intermareal donde es una especie dominante (Viana, Bode, and Fernández 2015). Gracias a sus frondosas hojas (Figura 1.11), que pueden alcanzar los 100 cm de longitud y que se disponen formando capas superpuestas (Garbary et al. 2006), esta alga ejerce una importante función protectora de la fauna y de la flora circundante.



Figura 1.11. *Fucus vesiculosus*. Imagen extraída de la base de datos OBIS (Ocean Biogeographic Information System).

#### 1.6.2.3. Morfología

Se trata de un alga de consistencia coriácea cuya coloración parda oscura u olivácea ennegrece con la desecación. Puede alcanzar un metro de longitud y se fija al sustrato mediante un disco (González, García Álvarez, and Rodríguez 1998).

Su morfología consiste en un talo que crece dicotómicamente y que está constituido por ápices vegetativos que durante el periodo reproductivo generan ápices (Koivikko et al. 2005).

En su estructura cabe destacar la presencia de vejigas llenas de aire (neumatocistos) dispuestas a lo largo de las hojas (Figura 1.12), cuya función principal es mantener las frondes a flote con la finalidad de captar la luz y los nutrientes necesarios (Garbary et al. 2006).



Figura 1.12. Imagen de las frondes de *Fucus vesiculosus* con los neumotocistos dispuestos de forma irregular. Imagen adaptada de Garbary et al 2016.

#### 1.6.2.4. Ciclo de vida

El ciclo reproductor de *Fucus vesiculosus* es exclusivamente sexual, presentando individuos gametófitos que producen solo gametos. Cuando *Fucus vesiculosus* alcanza el estado adulto en los extremos de las hojas se forman unas estructuras denominadas conceptáculos en los que se generan los gametos masculinos (anteridios) o los femeninos (oogonios). Alcanzada dicha etapa adulta, tanto los gametos masculinos como los gametos femeninos son liberados al agua donde se produce la fecundación y la posterior formación del cigoto. Este cigoto germinará y dará lugar a un nuevo individuo (González et al. 1998).







## **2. METODOLOGÍA** **EXPERIMENTAL**



## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1. PROCESADO DE MACROALGAS

#### 2.1.1. *Bifurcaria bifurcata*

##### 2.1.1.1. Obtención

Los especímenes de *Bifurcaria bifurcata* (BB) fueron recolectados en la ría de Corcubión por la asociación de mariscadores de Corcubión y en la costa de Ortigueira (A Coruña, Galicia) por la empresa Mar de Andora S.L.

##### 2.1.1.2. Procesado

En primer lugar, se procedió a lavar el alga para eliminar todos los posibles restos de epífitas y pequeños crustáceos adheridos a ella, así como sales y otros desechos.

A continuación, el alga se cortó en pequeños cilindros para acelerar el proceso de secado y se colocó en unas mallas metálicas (45 x 45 cm<sup>2</sup>) que permitían el flujo de aire a su través. Posteriormente se introdujeron en un secador convectivo (Challenge 250, Angelantoni, Italia). El secado de las algas se llevó a cabo a una temperatura de 35°C durante 12 horas, tiempo en el que se alcanzó el peso constante de las algas. La densidad de carga fue de 14,88 kg ± 0,04 kg.m<sup>-2</sup> (lecho) y las condiciones establecidas fueron de una humedad relativa (30 %) y velocidad del aire (2 m/s) constantes. La humedad final fue del 15 % (0,15 kg aire/kg sólido seco).

La determinación del peso seco se llevó a cabo por triplicado anotando el peso seco de las 3 muestras de algas en intervalos de una hora hasta alcanzar el peso seco constante. Las medidas se realizaron en una balanza analítica (Cobos D-600-CS, +/- 0,1 g, España). Una vez seca se procedió a cortar el alga en trozos más pequeños antes de introducirlos en un molinillo de escala de laboratorio (HGBTWT, Warring, EE.UU.). Posteriormente, el material algal molido se

sometió a una molienda más intensa en un molino ultracentrífugo (ZM 200, Retsch GMBH, Alemania) utilizando para ello un tamiz interno de 500  $\mu\text{m}$ . La velocidad de rotación del rotor fue de 8000 rpm obteniendo finalmente un micronizado de color verde.

#### 2.1.1.3. Conservación

El micronizado obtenido se introdujo en bolsas de polietileno que fueron posteriormente selladas al vacío. El proceso de envasado al vacío se llevó a cabo con un empacador de vacío (Sammic V201, España). Las bolsas fueron debidamente etiquetadas y se conservaron en nevera a 5 °C. Se mantuvieron en dichas condiciones hasta que se realizaron los diferentes ensayos.

### 2.1.2. *Fucus vesiculosus*

#### 2.1.2.1. Obtención

*Fucus vesiculosus* (FV) se recolectó manualmente en la costa noreste de España, concretamente en Noia (A Coruña) durante los meses de octubre y noviembre de 2014.

#### 2.1.2.2. Procesado

Una vez recolectada se llevó al laboratorio y se procedió a lavar cuidadosamente el alga eliminando los posibles restos de epifitas, arena, pequeños crustáceos y otros materiales adheridos a la pared algal.

El siguiente paso fue cortar las algas en pequeños cilindros para facilitar el proceso de secado. A continuación, se procedió a realizar el secado del alga de manera similar a como se realizó en el caso de *Bifurcaria bifurcata*. Para ello, se introdujeron las algas en un secador convectivo en el interior de bandejas metálicas (45 x 45  $\text{cm}^2$ ) manteniendo una densidad de carga de  $1,25 \pm 0,10 \text{ kg}\cdot\text{m}^2$ . Seguidamente se procedió a su secado a temperaturas de 35 y 75°C, manteniendo una humedad relativa del 30% y una velocidad del aire de  $2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  durante todo el proceso. La determinación del peso seco se realizó por triplicado.

Después del secado de las algas se procedió a su molienda. En primer lugar, se introdujeron en un molinillo (HGBTWT, Warring,

EE.UU.) para su troceo inicial. Seguidamente, se llevó a cabo una molienda más intensa en un molino ultracentrífugo (ZM 200, Retsch GMBH, Alemania) con un tamiz interno de 500  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de trabajo fueron una velocidad de rotación del rotor fue de 8000 rpm. Finalmente se obtuvo un micronizado de color pardo-amarillento.

### 2.1.2.3. Conservación

El material molido se introdujo en bolsas de polietileno que se cerraron herméticamente al vacío y se mantuvieron en la nevera a una temperatura de 5 °C en condiciones de oscuridad hasta el momento de su uso.

## 2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 2.2.1. Polifenoles totales

En este método los grupos hidroxilo de los polifenoles reaccionan con el complejo de Folin-Ciocalteu en medio alcalino, desarrollándose un color azul estable. La intensidad del color se mide a una longitud de onda de 765 nm y es directamente proporcional a la concentración de moléculas estándar que poseen grupos hidroxilo, por ejemplo, ácido gálico o floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno).

#### 2.2.1.1. Preparación de la muestra

La muestra debe solubilizarse en agua, preferentemente. Si está disuelta en etanol o metanol, debe diluirse al menos 1:1 en agua, para evitar la precipitación del reactivo de Folin-Ciocalteu. El volumen de ensayo requerido es de 500  $\mu\text{L}$ .

Se prepara una disolución del reactivo Folin-Ciocalteu partiendo del reactivo comercial (Panreac, Barcelona) en dilución 1 a 10. Este reactivo puede mantenerse en nevera por un periodo de un mes, aproximadamente.

### 2.2.1.2. Procedimiento

Se adicionan a todos los tubos 2,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y posteriormente, 2,0 ml de carbonato disódico al 7,5 %. Se colocan los tapones a los tubos y se agitan en un agitador vórtex.

Se llevan los tubos a incubar en un baño maría a 40 °C durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se dejan enfriar los tubos en la oscuridad. Las muestras se miden a una longitud de onda de 765 nm empleando agua en la celda de referencia y midiendo como blanco de reactivo una muestra con los reactivos y el agua. Debe ajustarse el procedimiento para que el software mida el blanco en la celda 1, tal como se establece en la recta de calibración (Figura 2.1) y la absorbancia del blanco frente a agua no debe superar 0,08 unidades. Las determinaciones se realizan como mínimo por duplicado.

La concentración se expresa como equivalentes en floroglucinol a partir de la recta de calibrado (Ecuación 1).

$$\text{Polifenoles totales (mg eq. de floroglucinol/L)} = [(Abs-b) / m] * [\text{Factor de dilución}]$$

[Ec.1]

Siendo:

m: pendiente de la línea recta,

b: ordenada en el origen

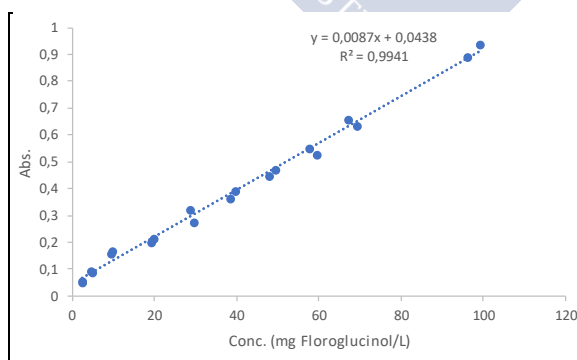


Figura 2.1 Recta de calibrado con floroglucinol.

### 2.2.2. Capacidad donante de protones.

Este método ha sido publicado originalmente por Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) y de él se han publicado pequeños cambios relacionados con los volúmenes. Se han realizado cambios en los volúmenes para adaptarse a los volúmenes de muestra y a un consumo menor de reactivos (Von Gadow et al. 1997), que es el que hemos adaptado en nuestro laboratorio. El radical libre DPPH• se emplea para testar la habilidad de compuestos fenólicos, presentes en diversos extractos naturales, para transferir átomos de H a los radicales. El radical DPPH• absorbe en el espectro visible a un máximo de 515 nm, y pierde el color característico al ceder su electrón desapareado a un protón. La habilidad donadora total de átomos H, por parte del extracto, se evalúa como índice EC50, que se define como la concentración necesaria para reducir el 50% radicales DPPH•.

Se empleó un equipo Jasco V-530 UV/Vis, (Tokio, Japón) provisto de 6 celdas de medida.

#### 2.2.2.1. Disolución de DPPH• en metanol

De acuerdo con la metodología de Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995), se prepara una disolución metanólica  $6 \times 10^{-5}$  M de DPPH•, a partir de una solución stock diez veces más concentrada. El peso molecular del DPPH es de 394,32 g/mol y su pureza es de 95%. De acuerdo con los cálculos que consideran el volumen requerido de 100 ml y la pureza del reactivo, se pesan en una balanza analítica 24,9 mg del radical, se colocan en un vaso de precipitados de 200 mL y se añaden aproximadamente 70 mL de metanol. Debe evitarse la exposición a la luz, por lo cual se emplearán matraces aforados de color ámbar.

El vaso se cubre con un vidrio de reloj y se coloca en una placa de agitación magnética. Se mantiene en agitación, protegiéndolo de la luz durante 15 minutos o hasta su completa disolución. Posteriormente, se transfiere a un matraz aforado de color ámbar y se enrasa. A partir del stock se realizan diluciones 1/10 (v/v) con metanol, esta es la solución de trabajo, que debe tener una absorbancia entre 0,66 y 0,69. Ambas disoluciones son estables máximo 6 horas si se mantiene siempre en nevera o en un frasco con hielo.

### 2.2.2.2. Preparación de la muestra

La muestra debe solubilizarse en agua, preferentemente, o en metanol, deben realizarse tantas diluciones sean requeridas a partir de una muestra concentrada stock. El volumen de ensayo requerido es de 20  $\mu\text{L}$ .

### 2.2.2.3. Curvas decaimiento de DPPH vs. tiempo

Se enciende el espectrofotómetro 1 hora antes de realizar las medidas y se ajusta a una longitud de onda de 515 nm. Se registra la absorbancia de al menos 3 disoluciones de trabajo de DPPH frente a un blanco de metanol. A continuación, se obtiene un promedio y se registra como absorbancia inicial ( $Abs_i$ ).

2.- Se transfieren alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  de las muestras problema a tubos de vidrio de 100  $\times$  11 mm d.i. Posteriormente, se inicia el cronómetro cuando se adiciona al primer tubo 980  $\mu\text{l}$  de disolución de trabajo “DPPH”; continuando con la adición hasta completar los 6 tubos, pues disponemos en nuestro caso de 6 celdas de medida automáticamente controladas. Inmediatamente, éstos se agitan en un vórtex y se transfieren a una cubeta de cuarzo o de plástico. Se realizan lecturas de la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm cada 5 min, hasta que la lectura de la muestra de mayor concentración alcance el estado estacionario, y se le denomina absorbancia final ( $Abs_f$ ).

La capacidad donante de protones, expresada como porcentaje de inhibición de DPPH se calcula según la ecuación 2.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{(Abs_i - Abs_f)}{Abs_i} \cdot 100$$

[Ec. 2]

Los florotaninos de algas, por su naturaleza oligomérica, presentan en general una cinética lenta, que muestra un decaimiento de la absorbancia por encima de los 30 minutos propuestos por Brand-Williams, mientras el reactivo control se mantiene estable. Esto nos llevó a realizar medidas hasta valores de tiempo superiores a 30



minutos, pero nunca por encima de 1 hora por cuestiones de pérdida de fiabilidad del método. En todos los casos, se observó una curva decreciente y no asintótica como es común en moléculas simples, como el ácido gálico, el ácido cafeico, el ácido clorogénico, etc. Esto también se observó en trabajos previos realizados en diversos extractos de materiales lignocelulósicos (Von Gadow et al, 1997, Moure et al. 2001).

### 2.2.3. Actividad antioxidante mediante ensayo FRAP

Este método permite determinar la capacidad antioxidante de una sustancia en base a su capacidad de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y se basa en el método publicado inicialmente por (Benzie y Strain 1999). En él se usa como oxidante un complejo de hierro que tiene la propiedad de cambiar a color. El cambio de color se produce en función del estado de oxidación del metal, la sal  $\text{Fe (III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$  (TPTZ: 2,4,6-tripiridil-S-triazina). El pH adecuado es de 3,6 pues a pH bajo se reduce el potencial de ionización e incrementa el potencial redox, causando un cambio en el mecanismo dominante de la reacción.

El reactivo denominado “reactivo FRAP”,  $[\text{Fe (III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , se prepara con una mezcla de TPTZ en HCl (ac), tampón acetato y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

El reactivo FRAP se convierte en el complejo  $(\text{Fe (II)TPTZ})_2]^{2+}$  en presencia de sustancias reductoras, generando un color intenso color azul que se determina colorimétricamente a 593 nm.

#### 2.2.3.1. Preparación de tampón acetato 300 mM pH 3,6

Se pesan 1,55 g trihidrato de acetato de sodio y se disuelven en 200 ml de agua. Se añaden 8 ml de ácido acético glacial y se transfieren a un matraz volumétrico de 500 ml y se enrasa.

#### 2.2.3.2. Preparación de disolución ácida de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$

Se pesan 15,62 mg de TPTZ (P.M. = 312,34 g/mol) y se disuelven en 3,5 ml de agua destilada, a continuación, se añade 17,6  $\mu\text{L}$  de HCl (37%). La mezcla se afora a 5 ml de en un matraz volumétrico.

#### 2.2.3.3. Mezcla reactivo FRAP

Se mezclan tampón acetato 300 mM, la disolución ácida de TPTZ arriba descrita y disolución de cloruro férrico, 20 mM en una proporción de 10: 1: 1. Se mantiene en agitación durante dos horas, se deja reposar y se filtra al día siguiente. En la recta de calibrado se empleará un reactivo FRAP exento de  $\text{Fe}^{3+}$ , empleando agua destilada en lugar de la disolución férrica.

#### 2.2.3.4. Preparación de patrones de $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

Se preparan 250 ml de una solución stock de cloruro ferroso (II) tetrahidratado 10 mM, para la lo cual se pesan 50,2 mg  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , se disuelven en agua y se afora hasta 250 ml. De esta disolución stock se preparan disoluciones patrón en el rango 0,1-1 mM.

Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de muestra con estándar a 3 mL de reactivo FRAP para preparar una recta de calibrado, en la cual se empleará la disolución de TPTZ exento de  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### 2.2.3.5. Curva de calibración

Se ajusta la longitud de onda a 593 nm. Se realiza un autocero en el espectrofotómetro con agua destilada como referencia. El blanco de cloruro (II) se realiza con agua, y posteriormente se leen los patrones de cloruro ferroso.

En la Figura 2.2 se muestra un ejemplo de curva de calibrado del complejo de  $\text{Fe}^{2+}$  con TPTZ.

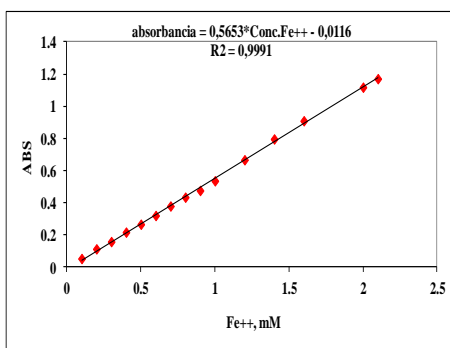


Figura 2.2 Curva de calibración del complejo  $F^{2+}$  con TPTZ.

La recta de calibrado se obtiene como:

$$\text{FeCl}_2 \text{ mM} = \frac{(\text{Abs}_{\text{standard}} - b)}{m} \quad [\text{Ec. 3}]$$

Siendo:

m: pendiente de la línea recta,

b: ordenada en el origen

$\text{Abs}_{\text{standard}}$ : lectura de absorbancia a 593 nm del patrón  $\text{FeCl}_2$

### 2.2.3.6. Ensayos con muestras

En los ensayos con muestras se debe leer un blanco de muestra que incluye 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 3 ml de la mezcla reactivo FRAP. Aproximadamente, se debe obtener una lectura en torno a 0,06 o inferior. El software del equipo espectrofotométrico resta automáticamente esta lectura al seleccionarlo como “blanco”. El ensayo con las muestras requiere de procesar lotes de 6 muestras a intervalos secuenciales de adición de mezcla reactiva FRAP de

aproximadamente 5 segundos, para lo cual se utiliza una pipeta de repetición Ritter ajustada a un volumen de 3 mL.

La ecuación 4 se utiliza para calcular la concentración mM de Fe (II) generada por la transferencia de 1 e- por la muestra-antioxidante. A mayor concentración de Fe (II), mayor actividad reductora de Fe (III) de la muestra-problema.

$$\text{Fe}^{2+}, \text{mM} = \left[ \frac{(\text{abs}_{\text{muestra}} - \text{abs}_{\text{control}})}{m} \right] \quad [\text{Ec. 4}]$$

Donde

Abs<sub>muestra</sub>: lectura de la muestra.

Abs<sub>control</sub>: lectura de la muestra control

La actividad reductora de Fe FRAP se expresa como mmol de Fe<sup>2+</sup>/ L de polifenoles totales.

#### 2.2.4. Actividad antioxidante: Ensayo ABTS.

Una de las formas de determinación de la actividad antioxidante de extractos disponibles en la literatura está basada en la reacción con el radical ABTS•+, (sal diamónica de 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), publicado por Re et al., (1999).

El radical presenta color azul/verde en su estado no reducido y un máximo de absorbancia en el rango ultravioleta a 342 nm. Una vez generado por la acción de enzimas oxidativas, como por ejemplo las peroxidasas, o químicamente (MnO<sub>2</sub>, peroxidisulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl], pasa a presentar nuevas características de absorción en el rango visible del espectro electromagnético, con máximos de absorbancia a 414, 645, 734 y 815 nm. La muestra que se ensaya, con capacidad antioxidante, revierte el estado de este radical a ABTS<sup>2-</sup>, que es incoloro y muestra una absorbancia máxima a 342 nm. A continuación, se detallan las etapas implicadas en este método.

### 2.2.4.1. Preparación del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$

Se prepara un volumen final de 25 ml del radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  a partir de 96 mg de  $\text{ABTS}^{2\cdot-}$ , 6,62 mg de peroxidisulfato potásico, en un medio de tampón fosfato a pH 7.4. Las concentraciones de  $\text{ABTS}^{2\cdot-}$  y de peroxidisulfato potásico resultan 7mM y 2,45 mM, respectivamente.

Se mantiene en agitación durante 16 horas bajo total oscuridad. Posteriormente, se guarda congelado a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  para utilizar en posteriores análisis.

### 2.2.4.2. Preparación de antioxidante de referencia: Trolox.

Se prepara una recta de calibrado de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico de Sigma-Aldrich) entre 0,1 y 1 mM.

### 2.2.4.3. Obtención de una curva de calibración

Se debe emplear, preferentemente, un espectrofotómetro que permita el ajuste de temperatura en las celdas. En nuestro caso se emplea un equipo Jasco V-500 con celda de 6 posiciones de lectura y cuya temperatura es controlable mediante flujo de agua desde un baño termostático Techne TE-8J exterior.

Se ajusta el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm. Se emplea agua como blanco y se determina la absorbancia del blanco que es el tampón fosfato. El reactivo  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  se diluye mediante tanteo hasta tener una absorbancia inicial de  $0,7 \pm 0,02$ . Esta disolución de partida de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  será el reactivo de trabajo, tanto con estándares como con muestras.

En nuestro equipo se preparan 6 celdas con 1 ml de reactivo de trabajo  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , esperando 5 min para alcanzar la temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Añadimos alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada uno de los patrones, y se inicia el cronómetro para controlar el tiempo de lectura en el espectrofotómetro, a tiempo inicial, 1 minuto y 10 minutos a 734 nm. La absorbancia disminuye con el tiempo

#### 2.2.4.4. Recta de respuesta de Absorbancia-Concentración de Trolox.

La Figura 2.3 muestra un ejemplo de la recta de calibrado donde se representa la Absorbancia frente a concentración de Trolox.

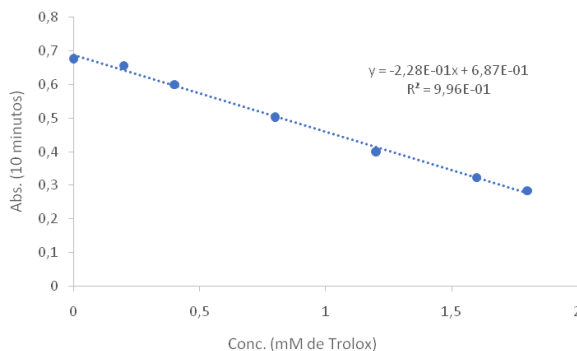


Figura 2.3 Recta de calibrado.

#### Linealización:

Recta de calibrado:  $-[\text{Trolox, mM}] = (\text{abstrolox} - b)/m \Rightarrow [\text{Trolox, mM}] = [(\text{abstrolox} - b)/m] \times -1$

Donde:

m: pendiente de la línea recta,

b: ordenada en el origen.

Abstrolox: lectura del patrón Trolox

$$\text{CAET}_{\text{muestra}} = \left[ \frac{(\text{abs}_{\text{muestra}} - \text{abs}_{\text{control}}) - b}{m} \right] \times -1$$

[Ec.5]

Donde:

Abs<sub>muestra</sub>: lectura de la muestra.

Abs<sub>control</sub>.: lectura del control

CAET<sub>muestra</sub>: Capacidad antioxidante equivalente Trolox de la muestra.

### 2.2.5. Determinación de CH (Método de Dubois).

Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados se hidrolizan en medio ácido para formar furfural e hidroximetilfurfural. Estos componentes reaccionan con el fenol dando una coloración amarillo-naranja muy estable.

La absorbancia derivada de esta disolución puede ser medida a 485 nm y la respuesta es lineal para concentraciones de glucosa, cuando se emplea como estándar, de hasta 100 mg/L.

La Figura 2.4 muestra la curva de calibración de carbohidratos totales.

#### 2.2.5.1. Procedimiento

Se prepara una disolución de fenol al 5% peso/volumen y una serie de disoluciones estándar de glucosa entre 0 y 100 mg/L.

Se toma 1 mL de muestra o de estándar en tubos de pyrex de pared gruesa y se les añaden 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Después de la adición del ácido se agitan en un agitador vórtex. Los tubos se dejan enfriar 10 minutos y a continuación se mantienen en baño termostatzado a 30 °C durante 30 minutos.

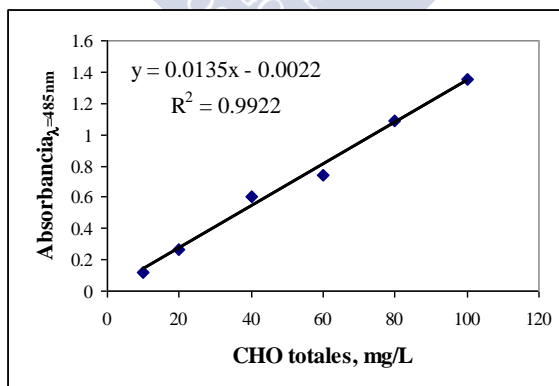


Figura 2.4 Curva de calibración de carbohidratos totales.

$$\text{Carbohidratos totales} \left( \frac{\text{mg glucosa}}{L} \right) = \left[ \frac{(\text{abs}_{\text{muestra}} - \text{abs}_{\text{control}}) - b}{m} \right] \quad [\text{Ec.6}]$$

Donde:

**m:** pendiente de la línea recta,

**b:** ordenada en el origen.

### 2.2.6. Contenido en fucoidanos.

La estimación del contenido en fucoidano se lleva a partir del contenido en carbohidratos sulfatados. De acuerdo con este método, publicado por Dodgson (1961), un ácido orgánico fuerte como el ácido tricloroacético rompe los enlaces éster de los polisacáridos sulfatados, liberándose los iones sulfato, que posteriormente precipitan con el reactivo BaCl<sub>2</sub>-gelatina, para generar una suspensión turbia estable de BaSO<sub>4</sub>. El grado de turbidez está relacionado linealmente con la concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y puede determinarse mediante espectrofotometría a 390 nm.

#### 2.2.6.1. Disolución al 4% (w/v) de ác. tricloroacético.

Se deben usar guantes para la preparación de esta solución, debido a que el ácido tricloroacético causa quemaduras en piel y mucosas. Se pesan 4 g en 70 mL de agua y se afora a 100 mL, trasvasándose a un frasco ámbar.

#### 2.2.6.2. Reactivo de cloruro de bario gelatinizado (BaCl<sub>2</sub>-gelatina)

Se pesan 2 g de gelatina comercial (Sigma-Aldrich) y se disuelven en 400 ml de agua caliente a 60-70 °C. Una vez disuelta la gelatina y a temperatura ambiente, se deja a 4 °C toda la noche. Se



pesan 2 g de  $\text{BaCl}_2$ , que se disuelven en la solución gelatinizada de  $\text{BaCl}_2$ , el aspecto nebuloso que adquiere es el normal. Se deja reposar 6 horas o hasta el día siguiente si no se cumple la condición de la absorbancia inicial. Una vez concluido el tiempo, la suspensión se mezcla con ácido tricloroacético al 4% en una proporción de 1:4 (v/v). Al medir su absorbancia en un espectrofotómetro Jasco debe mostrar una absorbancia en torno a 0,15 unidades. Para ello se deben utilizar cubetas de cuarzo de 1 cm. La suspensión de  $\text{BaCl}_2$ -gelatinizada se conserva a 4°C y puede ser usada durante 1 semana.

### 2.2.6.3. Solución estándar $\text{K}_2\text{SO}_4$ que contenga 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ión $\text{SO}_4^{2-}$

Se pesan 0.18 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  en un pesa-muestras, y se disuelve en 50 ml de agua destilada, después se afora a 100 mL en un matraz volumétrico. Esta solución contiene 1000  $\mu\text{g/mL}$ . La curva de calibración se prepara con diluciones seriadas a partir de estándar patrón, para obtener de 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  de ión  $\text{SO}_4^{2-}$ .

### 2.2.6.4. Obtención de una curva de calibración de iones $\text{SO}_4^{2-}$ .

Se toman alícuotas de 0,1 mL de cada una de las concentraciones del estándar de sulfato, se pipetea a tubos de vidrio y se mezclan con 1,4 ml de 4% ácido tricloroacético, seguido de 0,5 mL del reactivo de  $\text{BaCl}_2$ -gelatina.

Posteriormente, la solución se agita en un vórtex y se deja en reposo durante 15 min. El blanco contiene los reactivos excepto el sulfato y se mide frente a agua al igual que las muestras. Para ello, se emplean cubetas de cuarzo.

### 2.2.6.5. Hidrólisis ácida de las muestras

Es necesario realizar una hidrólisis a los extractos que contienen los carbohidratos sulfatados con ácido clorhídrico, antes de la determinación de contenido de sulfatos. Las condiciones de hidrólisis se adaptaron de Rodríguez-Jasso et al. (2011). Se toman entre 20 y 30 mg de extracto seco y se colocan en un tubo de vidrio roscado. A

continuación, se añaden 2 ml de HCl 4 M y la muestra se coloca sobre una placa calefactora bajo campana a 121 °C durante 2 h.

Se deja enfriar y se centrifuga a 9000·g (10,000 rpm) durante 10 minutos. El sobrenadante se separa y se colecta una alícuota de 0,1 ml para realizar el ensayo tal y como se describió en la sección anterior.

La Figura 2.5 muestra un ejemplo de recta de calibrado donde se representa la absorbancia frente a concentración de sulfatos equivalentes.

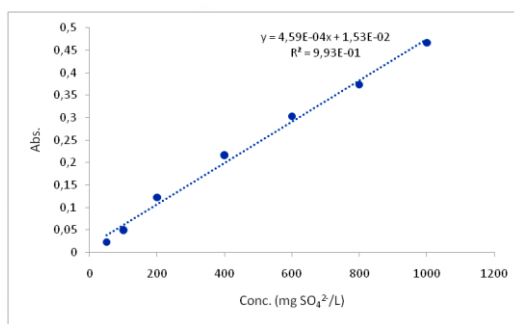


Figura 2.5 Recta de calibrado.

$$\text{Contenido eq. en } SO_4^{2-} \left( \frac{mg}{L} \right) = \left[ \frac{(abs_{muestra} - abs_{control}) - b}{m} \right] \quad \left| \quad [Ec. 7] \right.$$

## 2.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

### 2.3.1. Determinación de florotaninos mediante HPLC.

Este método se desarrolló en el laboratorio para poder expresar la concentración de florotaninos en las fracciones purificadas mediante preconcentración por cromatografía en gel y posterior cromatografía semipreparativa.

Gracias a este método se pudo expresar la concentración en micromolar considerándose el floroglucinol como la molécula modelo de los florotaninos. El área integrada de las fracciones se consideró equivalente a la de floroglucinol, como aproximación, pues apenas existen estándares de florotaninos oligoméricos.

#### 2.3.1.1. Equipo

Un equipo HPLC, cromatógrafo de líquidos de alta resolución Jasco, constituido por una bomba PU-980, un detector UV-Vis UV-1575, una unidad de gradiente cuaternaria LG-1580-04 y un controlador de temperatura de columna Jonnes chromatography Modelo 7971.

La columna de separación analítica fue una Kromasil 100 C18 (250 × 8 mm), y 5 µm diámetro de partícula.

#### 2.3.1.2. Gradiente de elución cromatográfica y condiciones de operación instrumental

Para llevar a cabo el procedimiento cromatográfico se utiliza un equipo HPLC Jasco V compuesto por una bomba binaria Jasco, un detector UV Jasco. La columna es una Kromasil C18 de 4 x 250 mm y granulometría de 5 µm y termostatzada a 30 °C.

El método de separación consistió en dos fases móviles A y B, siendo (A) agua de grado HPLC (Panreac, España) y (B) etanol de grado HPLC (Panreac, España). La elución se efectuó aplicando un gradiente lineal el cual se detalla en la Tabla 2-1.

**Tabla 2-1 Gradiente de elución empleado para llevar a cabo la elución cromatográfica.**

Tiempo (min)	Fases móviles
0-30	99 % A, 1 % B
30-32	5 % A, 95 % B
32-40	99 % A, 1 % B

La señal se registra a una longitud de onda de 270 nm. (Programa 1, equipo Jasco) y el caudal utilizado es de 1,2 ml/min.

#### 2.3.1.3. Curva de calibración

Las inyecciones en el cromatógrafo de las diferentes concentraciones de los estándares originaron perfiles cromatográficos que se muestran en la Figura 2.6. La concentración de ambos estándares es de 400 mg/L.

Se puede observar que los tiempos de retención de floroglucinol y resorcinol fueron  $8,9 \pm 0,4$  (DE) y  $14,4 \pm 0,5$  (DE), para  $n=8$  y 4, respectivamente.



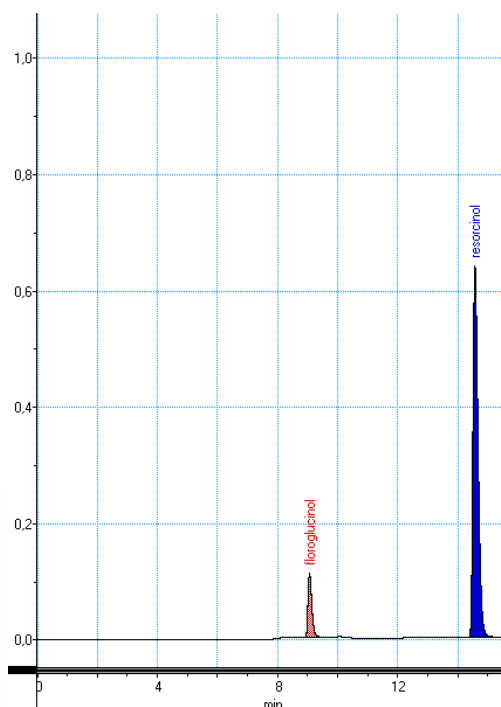


Figura 2.6 Cromatograma del estándar del floroglucinol y del resorcinol.

La Figura 2.7 muestra la curva de calibración del estándar de floroglucinol y la Figura 2.8 muestra la curva de calibración del estándar de resorcinol.

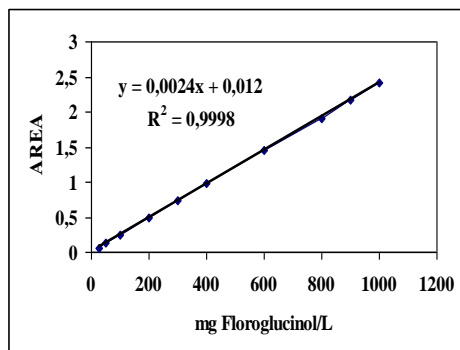


Figura 2.7 Curva de calibración del estándar de floroglucinol (400 mg/mL).

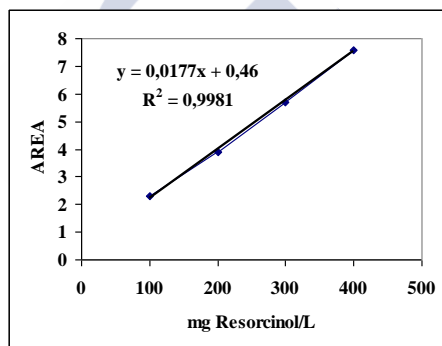


Figura 2.8 Curva de calibración del estándar de resorcinol (400 mg/mL).

## 2.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD METABÓLICA (MTT)

El ensayo de actividad metabólica MTT, es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad metabólica de las células para reducir un determinado compuesto, el MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2-5 difeniltetrazolium bromide).

El MTT es una sal de tetrazolio soluble en agua que se convierte en una sal de formazán insoluble por rotura del anillo de tetrazolio (Figura 2.9). El formazán es impermeable a las membranas celulares acumulándose en las células vivas (Beedessee et al. 2012). Dicha

transformación ocurre dentro de las mitocondrias de las células viables, gracias a la acción de las enzimas succinato deshidrogenasas mitocondriales. Esta reacción es fácil de observar incluso a simple vista ya que se produce un cambio de coloración de amarillo a violeta. El cambio de coloración mide la cantidad de células vivas capaces de llevar a cabo la transformación gracias a la actividad metabólica mitocondrial.

Para llevar a cabo el ensayo MTT las células se siembran en placas de 96 pocillos (P96). A continuación, se tratan con los diferentes tratamientos durante 24 y/o 48 horas y 4 horas antes de que finalicen los tratamientos se adiciona el MTT, a una concentración de 5 mg/mL. Se dejan incubar las células durante un periodo de cuatro horas a 37 °C y con una tasa de CO<sub>2</sub> del 5%. Posteriormente, la reacción se para adicionando como agente solubilizante el sodio dodecil sulfato (SDS) a una concentración del 10 % en HCl (0.01%).

Tras una incubación de 12 horas, en la cual se estabiliza la formación de la sal de formazán, se lleva a cabo la lectura espectrofotométrica en un lector de Elisa con una longitud de onda de 550 nm. La absorbancia de la solución se correlaciona directamente con la actividad metabólica de las células.

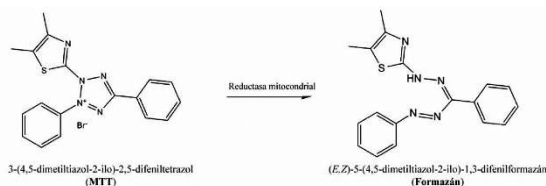


Figura 2.9 Formación de cristales de formazán a partir de MTT.

## 2.5. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR CON RESAZURINA.

### 2.5.1. Protocolo experimental

Se procede a sembrar en placas P96 la cantidad de 60000 células por pocillo en un volumen final de 200 µL. A continuación, se dejan sincronizar durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se añaden los

tratamientos y 24 horas después se lleva a cabo el test de viabilidad celular con Alamar Blue. Posteriormente, se aspira totalmente el medio de la placa de cultivo y se adicionan 20  $\mu\text{L}$  de una mezcla que contiene medio fresco con 10% de resazurina, a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ . Transcurridas 3 horas en la incubadora a 37°C y al 5 % de  $\text{CO}_2$ , se procede a la lectura espectrofotométrica a dos longitudes de onda (570 y 620 nm).

## 2.6. DETERMINACIÓN DE NITRITOS (TEST DE GRIESS)

El test de Griess es un test colorimétrico utilizado para la determinación de nitritos en células previamente estimuladas con sustancias que desencadenan o inhiben una respuesta inflamatoria. En nuestro diseño experimental hemos utilizado el lipopolisacárido (LPS) de *E.Coli* cuyo serotipo es el 026:B6.

El primer paso es la preparación del reactivo de Griess como se detalla a continuación. Para la preparación del reactivo de Griess se necesita mezclar en igual proporción el reactivo A y el reactivo B. Cada reactivo deber ser preparado individualmente siguiendo las siguientes indicaciones.

El reactivo A: Compuesto por Sulfanilamida 1% (p/v) en Ácido Fosfórico 1,24% (v/v). Para su preparación se necesita disolver 1 g de sulfanilamida en un volumen de 100 mL de ácido fosfórico al 1,24 %. Se prepara en un frasco ámbar que se almacena a 4°C.

El reactivo B está compuesto por N-1-naftilendiamina al 0,1% (p/v) en  $\text{H}_2\text{O}$ . Una vez preparado se guarda a 4°C en un frasco ámbar.

Una vez preparado el reactivo de Griess se sigue el siguiente protocolo experimental. Se siembran 60000 células en 200  $\mu\text{L}$  en placas P96 y se dejan sincronizar en el incubador durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se adicionan las fracciones a ensayar en presencia o no de un microlitro de LPS a una concentración final de LPS de 50 ng/mL. Posteriormente se deja incubar durante 24 horas a 37 °C y al 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se toman 130  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y el mismo volumen de reactivo de Griess. El siguiente paso es dejar incubar 30 minutos en un lugar oscuro y transcurrido dicho tiempo se realiza la lectura de la absorbancia a 550 nm. A



continuación, se realiza el cálculo de la concentración de nitritos a través una curva patrón de nitritos de sodio.

La Figura 2.10 muestra la reacción de Griess. Esta reacción se basa en la reacción de los nitritos con la sulfanilamida dando lugar al ácido 4-diazobenceno sulfónico. A continuación, se produce la condensación de este reactivo intermediario con la  $\alpha$ -naftilamina dando lugar al ácido-diazoico, de coloración rojo-violeta.

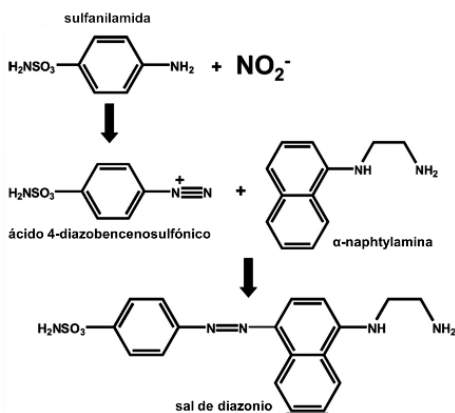


Figura 2.10 Reacción de Griess.



A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the slide. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the full name 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

### **3. HIPÓTESIS Y** **OBJETIVOS**



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a estudios preliminares basados en el contenido en polifenoles y actividad antioxidante de fracciones de polifenoles y fucoidanos presentes en las algas pardas, se dispuso a aislar fracciones de polifenoles y de fucoidanos con la hipótesis de que presenten alguna actividad antioxidante y cuyo contenido en polifenoles sea relevante.

Una vez aisladas las fracciones correspondientes de las dos algas hipotetizamos que algún componente de estas fracciones pudiera poseer propiedades antioxidantes y/o antiinflamatorias. De hecho, en publicaciones previas se ha demostrado que las algas ricas en compuestos antioxidantes y antiinflamatorios pueden ser un recurso muy importante para el aislamiento y/o la producción masiva de sustancias farmacológicas útiles para el tratamiento y o la prevención de enfermedades con componente inflamatoria. Por ejemplo, algunos compuestos extraídos de ciertas macroalgas presentan propiedades beneficiosas como la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antitrombótica.

En consecuencia, de estos datos previos decidimos centrar nuestra atención sobre el estudio de los potenciales efectos farmacológicos de las fracciones extraídas con diferentes solventes mediante ensayos *in vitro* con células de cartílago articular y con macrófagos. Asimismo, nuestra hipótesis de trabajo plantea una potencial actividad antiproliferativa celular de estas fracciones ya que en otras algas se han extraído moléculas muy potentes con actividad antitumoral.

Con este fin, llevamos a cabo una serie de experimentos dirigidos a valorar la actividad antiproliferativa de estas fracciones en línea celular de mieloma múltiple humano y en células de hepatoma.

Esta tesis tiene como objetivos generales los siguientes:

- Estudiar las condiciones de secado (efectos de la temperatura de secado) para conseguir una mínima degradación de los polifenoles y conseguir una máxima actividad antioxidante en extractos de las algas *Bifurcaria bifurcata* y *Fucus vesiculosus*.
- Estudiar la influencia de factores operacionales en el contenido en polifenoles de los extractos a partir de dichas algas mediante diferentes métodos *in vitro*: Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP, ABTS.
- Extraer y caracterizar las fracciones de florotaninos de la macroalga *Bifurcaria bifurcata* mediante diferentes métodos de extracción, con el fin de identificar posibles fracciones bioactivas de interés para obtener componentes de interés farmacológico.
- Extracción y caracterización de fucoidanos de *Bifurcaria bifurcata*.
- Evaluar la bioactividad de fracciones de florotaninos obtenidos por los diferentes métodos de extracción en sistemas celulares.

Para la consecución de los objetivos generales se llevaron a cabo una serie de objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica de los métodos de extracción de polifenoles y fucoidanos.
- Optimización de la extracción de polifenoles y fucoidanos.
- Purificación de las fracciones de florotaninos a partir de los extractos obtenidos utilizando cromatografía en gel de Amberlite seguida de cromatografía semi-preparativa.
- Análisis estructural de las fracciones de florotaninos mediante diferentes técnicas.

### 3. Objetivos

- Obtención de fracciones de fucoidano purificado en condiciones previamente establecidas y posterior depolimerización y análisis estructural.
- Aprendizaje de las técnicas de cultivos celulares y mantenimiento de líneas celulares.
- Estudios *in vitro* (MTT, resazurina).
- Búsqueda de potencial actividad citotóxica en una línea celular murina.
- Búsqueda de potencial actividad citotóxica en líneas tumorales humanas.
- Búsqueda de otras actividades en una línea de macrófagos murinos.









## **4. INFLUENCIA DE FACTORES OPERACIONALES**



## 4. INFLUENCIA DE FACTORES OPERACIONALES.

### 4.1. INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de conocer la influencia de los factores operacionales en el contenido en polifenoles y capacidad antioxidante de las macroalgas *Bifurcaria bifurcata* y *Fucus vesiculosus*, se estudió el efecto de las condiciones de secado sobre la capacidad antioxidante, empleando el ensayo DPPH como método de evaluación. También se estudió el contenido en polifenoles totales según el método de Folin Ciocalteau. Se partió de muestras de *Bifurcaria bifurcata* recolectada en la ría de Corcubión por la Asociación de Mariscadoras en noviembre del año 2015 y de *Fucus vesiculosus* recolectadas en la playa de O Testal (ría de Muros y Noia).

### 4.2. METODOLOGÍA

La metodología llevada a cabo se ilustra de modo esquemático en la Figura 4.1.

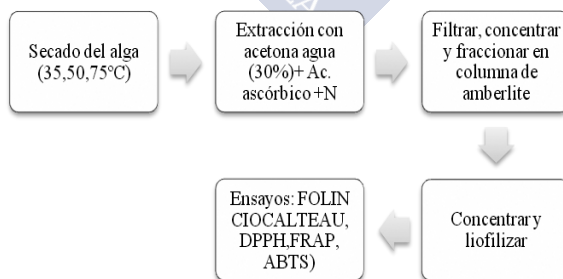


Figura 4.1 Obtención de florotaninos para su estudio por diferentes ensayos.

Se tomaron las algas secas obtenidas según la metodología descrita en el capítulo 2. Cómo se describe en dicho capítulo, por ejemplo partiendo del alga *Fucus vesiculosus*, el alga se secó en un secadero convectivo en condiciones controladas de carga constante, con el objeto de reducir el contenido cerca de la humedad de equilibrio (Moreira et al. 2016; Moreira et al. 2017).

Las muestras de alga se secaron a diferentes temperaturas con la finalidad de comparar condiciones de secado suaves, no superando 35 °C y durante 24 horas, con condiciones de tiempo corto y alta temperatura (75 °C, 2 horas) y el efecto de las condiciones de secado sobre la capacidad antioxidante, empleando el ensayo DPH como método de evaluación.

Una vez realizado el secado, se molió el alga y se separaron las partículas resultantes con un tamiz de 0,5 mm. Estas partículas fueron recogidas y envasadas al vacío para garantizar su preservación y evitar la contaminación de las mismas. A partir de estas muestras se realizaron los procesos de extracción y fraccionamiento que se describen a continuación.

#### **4.2.1. Obtención de extractos y fracciones. Extracción con acetona.**

##### **4.2.1.1. Extracción**

A continuación, se describe el procedimiento llevado a cabo con *Bifurcaria Bifurcata*, siendo el mismo utilizado posteriormente para *Fucus vesiculosus*. Siguiendo el procedimiento llevado a cabo por otros autores (Koivikko et al. 2007), a partir de muestra micronizada de *Bifurcaria bifurcata* se realizó la extracción con acetona al 70 %. La acetona es apolar y extrae los compuestos apolares como las clorofilas y los carotenos (responsables de la tonalidad verdosa). Sin embargo, no es lo suficientemente polar para extraer otros compuestos. Para ello se necesita diluir la acetona en agua obteniendo así un disolvente con un carácter más polar.

El procedimiento de extracción llevado a cabo se describe a continuación. En primer lugar, se tomaron 5 g de alga micronizada y se diluyeron en 150 ml de disolución que contenía 105 ml de acetona y 45 ml de agua destilada, fijando así una relación del 30 %. Todo ello

se llevó a cabo en el interior de botellas de rosca de 250 ml de volumen (Figura 4.2). Con la finalidad de prevenir la oxidación y siguiendo el procedimiento llevado a cabo por otros autores (Koivikko et al. 2007), se adicionaron 45 mg de ácido ascórbico (0,1%). Asimismo, también se introdujo nitrógeno en las botellas con el objetivo de desplazar el oxígeno presente y evitar la oxidación de los florotaninos. Dicho procedimiento se repitió por triplicado, obteniendo 3 réplicas denominadas BB4, BB5 y BB6.

A continuación, las disoluciones se sometieron a un proceso de agitación en un agitador de movimiento orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific, EE. UU.), a una velocidad de 200 RPM y a una temperatura constante de 37°C durante 2 horas.

Transcurrido dicho tiempo, se filtró el contenido de las botellas con la ayuda de un decantador Büchi y papel de filtro obteniendo así un extracto algal de coloración verde. La parte sólida retenida en el filtro, perteneciente al tejido algal, se desechó.

El volumen obtenido se llevó al rotavapor (R-114, Büchi, Suiza) para eliminar el contenido en acetona, manteniendo una temperatura del baño de 40 °C. El extracto se mantuvo en el rotavapor hasta casi alcanzar la sequedad. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada para recuperar el material concentrado adherido a las paredes del balón.

Debido a la presencia de agregados, el volumen obtenido se llevó al baño ultrasonidos (SH40, Elmasonic, Alemania) durante 10 minutos, logrando así disgregar y solubilizar el material precipitado. Los florotaninos pueden formar complejos poliméricos dando lugar a agregados, que se dispersan al someterlos a ultrasonidos debido a que son compuestos solubles. Por el contrario, la fracción lipídica al ser insoluble no se dispersará. Dicho procedimiento es necesario para obtener una disolución apta para trabajar en la columna. Una vez obtenida una disolución homogénea se transfirió a un matraz aforado y se enrasó a un litro con agua destilada (Figura 4.2), manteniéndolo en nevera hasta su uso, evitando la proliferación de hongos. Según estudios previos (Lorenzo et al. 2014) dicho volumen de muestra debe introducirse en una columna de cristal rellena de gel de Amberlite y posteriormente debe ser lavada con 5 litros de agua.



Figura 4.2. Frasco y matraz con extracto.

El siguiente paso fue preparar la columna de vidrio rellena de gel de Amberlite en la que posteriormente se introdujo el volumen de extracto contenido en el matraz aforado.

#### **4.2.2. Fraccionamiento mediante cromatografía en gel de Amberlite XAD-16**

El protocolo de fraccionamiento se llevó a cabo a partir de los estudios previos de autores como Lorenzo et al. 2014.

Para llevar a cabo el fraccionamiento mediante la cromatografía de intercambio en gel se utilizó una columna de 2,5 cm de diámetro y 47 cm de longitud, la cual se colocó en un soporte en vertical. Como fase estacionaria se eligió un material polimérico orgánico. Entre los disponibles en el mercado se seleccionó el Amberlite XAD16, comúnmente utilizado por otros autores. El motivo por el cual se eligió este tipo de gel en vez de otros como los geles de Sephadex LH-20 fue para evitar problemas de contaminación con hongos. Los geles de Sephadex están compuestos básicamente por carbohidratos por lo que son propensos a ser atacados por los hongos.

La fase estacionaria se preparó como se describe a continuación. Se pesaron 200 g de Amberlite XAD16 (Sigma-Aldrich, EEUU) y se depositaron en un vaso de precipitados. A continuación, se hidrataron con 200 ml de agua destilada y se agitaron en un agitador magnético a temperatura ambiente durante 10 minutos, con un imán en su interior.

El siguiente paso fue realizar 5 lavados con agua destilada (relación 1:1) para retirar el contenido en sal del interior de la resina.

Una vez lavado el Amberlite, se introdujo en una columna de vidrio (2,5 cm de diámetro x 47 cm de altura) y se dejó decantar. Se colocó el adaptador de flujo en la parte superior de la columna y se conectó a una bomba peristáltica. Se procedió al equilibrado de la columna, dejando pasar agua destilada a su través hasta que se observó un goteo estable y se alcanzó un pH de 7. Con este procedimiento, se consiguió eliminar toda la sal contenida en la resina. Para ello se estableció un caudal de trabajo de 110 ml/h durante 9 horas, tiempo necesario para llevar a cabo el equilibrado de la columna.

El siguiente paso fue cargar el litro de extracto acuoso contenido en el matraz aforado en la parte superior de la columna. El procedimiento se llevó a cabo teniendo en cuenta las indicaciones de la ficha técnica del Amberlite, en la que se especifica que se debía trabajar con un flujo comprendido entre 0,5-2 volúmenes de lecho por hora. Por lo tanto, se realizó el cálculo del caudal de trabajo a diferentes posiciones de velocidad de la bomba peristáltica y se estableció un caudal de 115 mL/h.

Tras la carga de la muestra se procedió al lavado de la columna con 5 litros de agua destilada. La finalidad de dicho lavado es eliminar los compuestos polares y el ácido ascórbico, para ello se trabajó con un caudal mayor de 600 mL/h.

En la Figura 4.3 se muestra el montaje de la columna utilizado durante la cromatografía en gel de Amberlite.

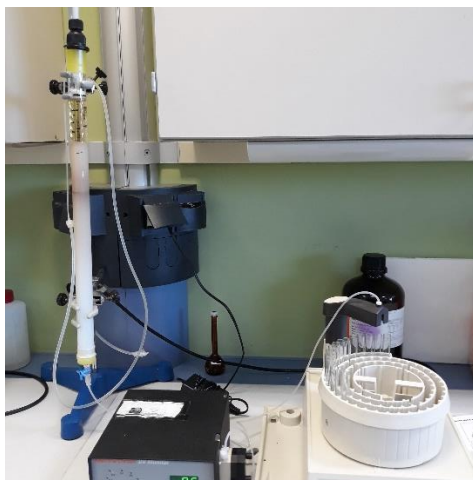


Figura 4.3 Montaje utilizado para separar fracciones por cromatografía en gel

El siguiente paso consistió en realizar la elución de la muestra con etanol. Los compuestos polifenólicos eluyen de la columna cromatográfica gracias al etanol que es capaz de extraer los compuestos apolares del Amberlite. Por lo tanto, no sólo eluiran los polifenoles sino todos los compuestos apolares retenidos por el Amberlite. Investigadores como Lorenzo et al., 2014, llevaron a cabo la elución de los compuestos polifenólicos con etanol guardando una relación de 3 volúmenes de etanol al 96 % por litro de extracto acuoso. Siguiendo estas indicaciones, se llevó a cabo la elución de los compuestos polifenólicos con 3 litros de etanol al 96 % (w / w) con un caudal de trabajo de 360 mL/h. Los florotaninos se colectaron en tubos de 7 mL de volumen (Figura 4.4) utilizando un colector de fracciones (2110, Bio-Rad, EEUU). El registro de los datos y la visualización del espectro obtenido se realizaron con el software PowerChrom 2.5 (eDaq Technologies, Australia), que permitió diferenciar las distintas fracciones de florotaninos presentes en la muestra.

Previamente se calculó el tiempo necesario para coleccionar las fracciones. Para ello se tuvo en cuenta el volumen de cada tubo



#### 4. Influencia de factores operacionales.

colector, 7 mL, y el caudal de trabajo para la elución de las muestras, 360 mL/h. Por lo tanto, el tiempo necesario para coleccionar las muestras fue de 60 segundos. Los tubos obtenidos se separaron en base a los resultados cromatográficos obtenidos.



Figura 4.4. Colector y tubos con fracciones de BB en su interior.

Posteriormente, una vez agrupados los tubos en función de las fracciones obtenidas, se procedió a la concentración de las muestras en el rotavapor.

Finalmente, se introdujeron en viales de cristal (

Figura 4.5) y se congelaron a una temperatura de  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su liofilización.



Figura 4.5. Fracciones concentradas en el rotavapor.

Todo el procedimiento desarrollado se llevó a cabo para las 3 réplicas, BB4, BB5 y BB6.

Debido a la fotosensibilidad de los polifenoles, se mantuvieron protegidos de la luz directa durante todo el procedimiento.

Con el objetivo de preservar las fracciones obtenidas en el proceso de fraccionamiento se liofilizaron las muestras en un liofilizador (Telstar LyoQuest-55, Telstar Technologies, España) a -55 °C y 0,5 Pa durante 30 horas (Figura 4.6/Figura 4.6).



Figura 4.6. Liofilizador (Telstar LyoQuest-55).

Tras la liofilización se procedió a la separación de la muestra en función de su peso molecular. Se separaron las fracciones mayores de 3000 Dalton (Da) de las de inferior peso molecular con el objetivo de obtener fracciones que puedan ser utilizadas en ensayos *in vitro*. Para ello se disolvieron previamente en etanol (son insolubles en agua) y se filtraron mediante filtros. Según publicaciones previas el 75 % de los polifenoles son capaces de atravesar el filtro de 3000 Da. El proceso se detalla a continuación: Se pesaron 30 mg del extracto liofilizado obtenido anteriormente y se disolvieron en 10 ml de una disolución de

etanol-agua al 30% (v/v) con el objetivo de solubilizar los compuestos fenólicos. Para facilitar este proceso, se dejaron en el baño ultrasonidos (S40H, Elmasonic, Alemania) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo la muestra se introdujo en el interior de filtros centrífugos (Amicon Ultra-4, MWCO 3K, Merck Millipore, Irlanda) que se llevaron a una centrifuga (Sigma 2-15, Laborzentrifugen GmbH, Alemania) a 4000 g durante 10 minutos, según las indicaciones del fabricante de los filtros centrífugos. Tras este procedimiento se obtuvieron oligómeros de florotaninos no poliméricos.

### 4.3. RESULTADOS

La Figura 4.7 y la Figura 4.8 muestran el cromatograma de elución de las fracciones obtenidas a partir de *Fucus vesiculosus* en las dos condiciones de secado.

De los eluídos de la columna de Amberlite XAD16 se separan dos fracciones principales, “Fracción 1”, que se recoge entre los 10 y los 25 minutos y “Fracción 2”, que se recoge entre los 25 y 40 minutos. La primera fracción representará una fracción de polifenoles de menor tamaño y mayor polaridad que la fracción que eluye más tarde.

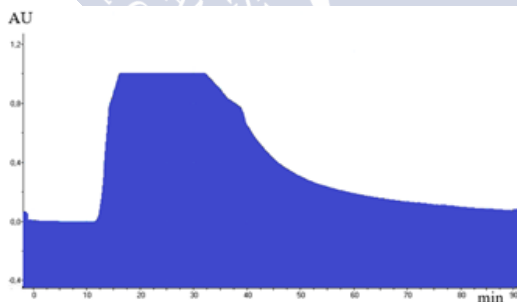
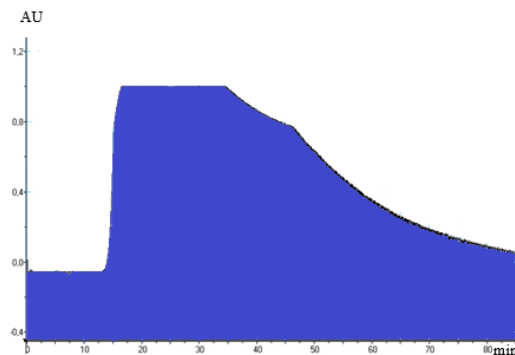


Figura 4.7 Secado de *Fucus vesiculosus* a 35 °C.

Figura 4.8 Secado de *Fucus vesiculosus* a 75 °C

En algunos casos, tanto con *Fucus vesiculosus* como con *Bifurcaria bifurcata*, no se pudo obtener un material liofilizado recuperable directamente, al tener un gran contenido en compuestos fenólicos y ser el resultado una masa semisólida. En estos casos, se recuperó el material con metanol para los ensayos de contenido en polifenoles y determinación de actividad antioxidante y se calculó la masa correspondiente al sólido por diferencia de peso.

La extracción llevada a cabo mediante cromatografía en gel de Amberlite XAD-16 a partir de un extracto en acetona-agua de *Bifurcaria bifurcata*, dio lugar a una fracción polimérica rica en florotaninos. En la (Figura 4.9) se muestra la fracción polimérica correspondiente a la muestra BB5 la cual se recogió desde el minuto 5 hasta el minuto 77.

#### 4. Influencia de factores operacionales.

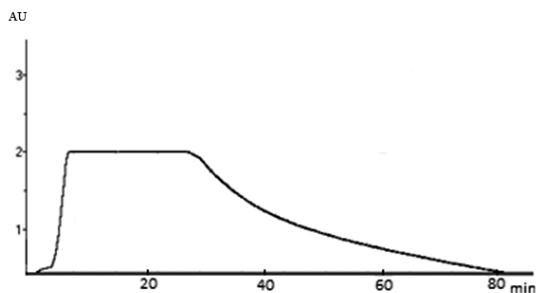


Figura 4.9 Perfil de elución de la fracción polimérica BB5.

##### 4.3.1. Actividad antioxidante mediante método DPPH.

Se llevo a cabo la determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH en fracciones polifenólicas de *Fucus vesiculosus* y *Bifurcaria bifurcata*, obtenidas mediante preconcentración en Amberlite XAD-16.

###### 4.3.1.1. *Fucus vesiculosus*

Se empleó inicialmente el ensayo DPPH como técnica de selección de condiciones de condiciones de secado con la especie *Fucus vesiculosus*. Se determinó en contenido en polifenoles totales de las fracciones obtenidas mediante cromatografía y se obtuvieron las actividades específicas, referidas tanto a milimoles de polifenoles totales como a mg de material liofilizado.

En las Figura 4.10 (a-f) se muestran resumidos los resultados de actividad antioxidante de las fracciones separadas e identificadas como "Fracción 1" y "Fracción 2".

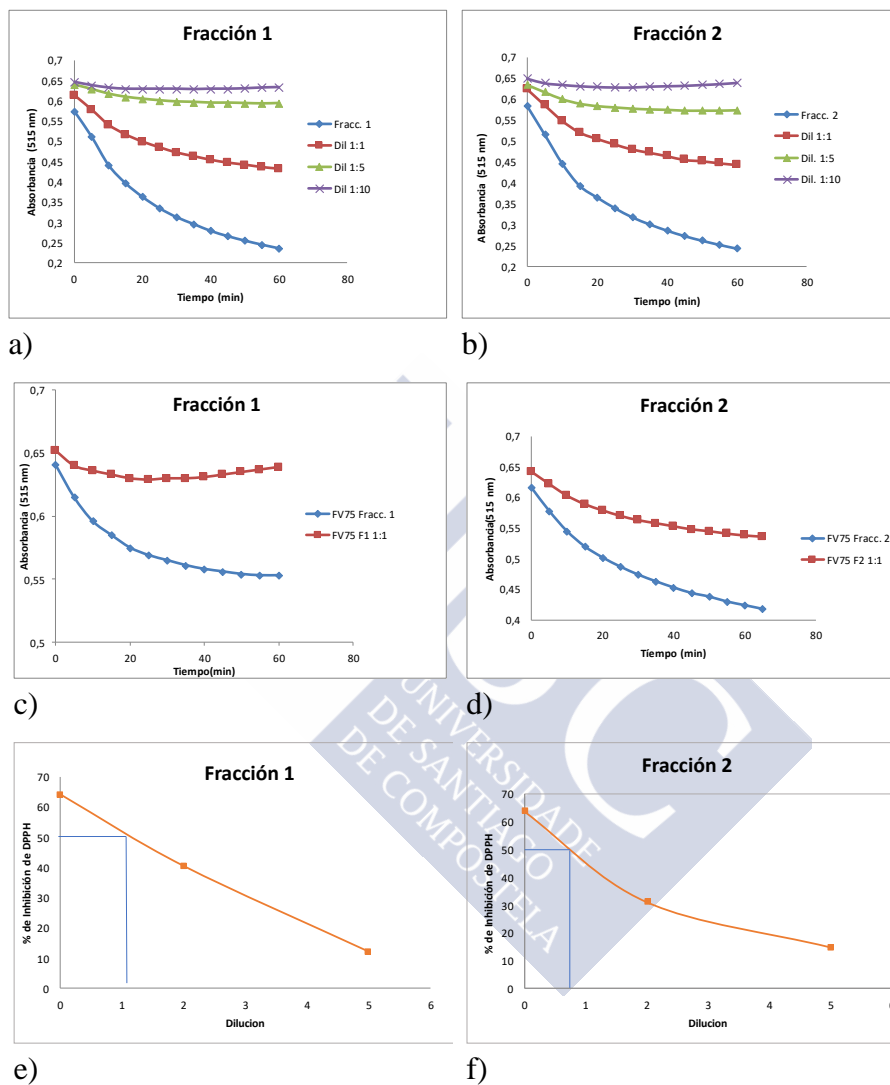


Figura 4.10. Inhibición de DPPH de extracto acuoso de *Fucus vesiculosus* secado a 35 °C (a, b) y 75 °C (c y d), partiendo de 500 mg de liofilizado/L y diversas diluciones. Interpolación para obtener EC<sub>50</sub> (e, f) a partir de la relación de dilución.

#### 4. Influencia de factores operacionales.

Tabla 4-1 Contenido en polifenoles de extractos acuosos de *Fucus vesiculosus* y actividad antioxidante como captación de radical DPPH. \*n.d.: no determinado, a 500 mg eq. de floroglucinol/L no se llegó al 50% de inhibición de DPPH; R: N° de réplica completa SD: desviación estándar.

		Fracción 1	Fracción 2
	PT (mg eq. de floroglucinol/L) recogido de la columna	R1: 151 ± 9,35 R2: 127 ± 46 Media ± SD: 139 ± 32,8	R1: 181 ± 25 R2: 269 ± 51 Media ± SD: 225 ± 62
	PT (mg eq. de floroglucinol/mg liofilizado)	R1: 0,302 R2: 0,255 Media ± SD: 0,278 ± 0,2	R1: 0,362 R2: 0,5396 Media ± SD: 0,451 ± 0,125
Secado a 35 °C	EC <sub>50</sub> (mg eq de floroglucino/mmol DPPH)	R1: 32,3 R2: 57,0 Media ± SD: 44,6 ± 17	R1: 42,5 R2: 48,5 Media ± SD: 45,5 ± 4,2
	EC <sub>50</sub> (mg eq. de liofilizado/mmol DPPH)	R1: 126,7 R2: 189 Media: 158 ± 44	R1: 133,7 R2: 155,5 Media: 144 ± 15
Secado a 75 °C	EC <sub>50</sub> (mg eq. de liofilizado/mmol DPPH)	n.d. (17,1% Inhibición)*	n.d. (37,1% Inhibición)*
	EC <sub>30</sub> (mg eq de floroglucino/mmol DPPH)	-	57 ± 15
	EC <sub>30</sub> (mg eq. de liofilizado/mmol DPPH)	-	150 ± 15

**Tabla 4-2 Capacidad reductora de las muestras a partir de los resultados del ensayo de poder reductor de  $\text{Fe}^{3+}$  (FRAP), estandarizadas a 500 mg/L de concentración de liofilizado.**

Temperatura de secado	Muestra	$\text{Fe}^{2+}$ (mM)
35 °C	Fracción1	$0,604 \pm 0,041$
	Fracción2	$1,421 \pm 0,575$
75 °C	Fracción 1	$0,6205 \pm 0,09$
	Fracción 2	$0,782 \pm 0,176$

**Tabla 4-3 Capacidad reductora de las muestras a partir de los resultados del ensayo ABTS, estandarizadas a 500 mg/L de liofilizado.**

Temperatura de secado	Muestra	Equivalentes Trolox (mM)
35 °C	Fracción 1	$1,605 \pm 0,654$
	Fracción 2	$8,493 \pm 10$
75 °C	Fracción 1	$1,575 \pm 1,138$
	Fracción 2	$0,992 \pm 0,22$

A partir de los valores  $\text{EC}_{50}$  obtenidos en nuestros resultados, se llevó a cabo una comparación con los valores reportados en otras publicaciones.

Lo ideal para contrastar datos de actividad antioxidante por métodos como el DPPH es indicar las actividades  $\text{IC}_{50}$  o  $\text{EC}_{50}$  en forma de milimoles o micromoles de sustancia activa por mmol de radical DPPH. Pero esto no es frecuente, los autores suelen dar la concentración que reduce la absorbancia del DPPH a partir de una



dilución de su extracto o fracción; publicando el valor en  $\mu\text{g/mL}$ , pero no como microgramos de polifenoles, sino de su extracto ó de la fracción. Por ejemplo, (Kirke et al. 2017) obtuvieron diversas fracciones de florotaninos purificados y fraccionados por peso molecular, a partir de *Fucus vesiculosus*, estudiando su estabilidad durante la conservación. Así, reportan valores de  $\text{IC}_{50}$  estables para casi todas las fracciones en torno a  $20 \mu\text{g/mL}$ , subiendo tras 8 semanas a  $\text{IC}_{50}$  al rango  $30\text{-}40 \mu\text{g/mL}$  a temperatura ambiente y hasta el rango de  $70\text{-}80 \mu\text{g/mL}$  a  $50^\circ\text{C}$  por la pérdida de actividad. Nuestros valores comparables serían, expresados en  $\mu\text{g}$  de liofilizado/ $\text{mmol}$ , de 423 para la Fracción 1 y de 464 para la Fracción 2, calculado a partir de los valores de la tabla Tabla 4-1 (en el presente trabajo, la disolución de partida en el ensayo equivale a  $170 \text{ mg liofilizado/mmole}$  de DPPH). Sin embargo, Pinteus et al. 2017 reportan valores de florotaninos de *Fucus spiralis* en un rango muy variable, que va desde los 9,7 hasta los  $183 \mu\text{g/mL}$ . El problema de establecer una comparación es que la concentración de DPPH en el ensayo fue diferente, aunque se puede igualmente concluir que la actividad reportada por ellos fue mayor. Sólo el extracto de la Fracción 1 de *Bifurcaria bifurcata* (Tabla 4-4) estaría en este rango de actividades antioxidantes en cuanto a capacidad donante de protones.

Por el contrario, otros autores como Zubia et al. (2009) reportaron valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $0,46 \text{ mg/mL}$  a partir de *Fucus ceranoides*, que convenientemente convertidos a partir de la información que aportan, equivaldrían a  $729 \text{ mg}$  de extracto/ $\text{mmole}$  de DPPH, siendo la actividad observada considerablemente menor. Pero hay que tener en cuenta que ellos emplearon un extracto obtenido mediante extracción acelerada, no una fracción purificada. También reportan valores para *Bifurcaria bifurcata*,  $\text{IC}_{50}$  de  $0,56 \text{ mg/mL}$ , que equivaldría a  $880 \text{ mg}$  de extracto/ $\text{mmole}$  de DPPH, muy superiores a los nuestros y por tanto mostrando una actividad antioxidante mucho menor que las fracciones obtenidas en este trabajo.

También encontramos en la literatura autores que reportan tanto la  $\text{IC}_{50}$  referida a polifenoles totales como a  $\text{mg}$  de extracto seco, como Audibert et al. 2010, permitiéndonos hacer una comparación. Estos autores llevaron a cabo el fraccionamiento mediante técnicas

cromatográficas y diálisis, y emplearon membranas de 50 kDa y 2 kDa como tamaños de corte. La fracción inferior a 2 kDa les dio una actividad equivalente a 93,1 mg liofilizado/mmol DPPH o 19,5 eq. de floroglucinol/mmol de DPPH, en un rango parecido a los obtenidos en este trabajo, mientras que la fracción entre 2 y 50 kDa fue más activa si se expresa en masa, en torno a 23 1 mg liofilizado/mmol DPPH, pero similar actividad si se refiere a contenido en polifenoles, en torno a 18 eq. de floroglucinol/mmol de DPPH. Los valores de fracciones de *Fucus vesiculosus* en este trabajo (Tabla 4-1) fueron un poco menores en el rango con un promedio de 45 mg eq. de floroglucinol/mmol de DPPH.

Zou et al. (2008) estudiaron la actividad antioxidante utilizando estándares, lo cual nos permite establecer un contraste entre la heterogeneidad de una fracción y una sustancia representativa, pues al final cuando expresamos la actividad como mg equivalentes de floroglucinol no estamos más que haciendo una representación de la familia de los florotaninos. Emplearon, entre otras sustancias floroetol y biecol, siendo la actividad inhibidora de DPPH determinada mediante resonancia de spin electromagnético. Obtuvieron una actividad de inhibición de DPPH en torno a 10 micromolar de biecol, lo cual equivaldría 166 mmol de biecol/mmol de DPPH, un valor muy alto. Con un peso molecular de 126, los valores de fracciones obtenidos estarían entre 0,16 mmol de polifenol/mmol de DPPH (en este trabajo) y 0,4 mmol de polifenol/mmol de DPPH (Audibert et al. 2010), de modo que no son comparables. El valor para el floroglucinol se puede obtener de Goswami et al. 2016 y resulta 0,36 mmol de floroglucinol/mmol de DPPH. Esta gran diferencia de rango se explica porque estos autores realizan diluciones a partir de las cuales se obtiene qué concentración daría lugar a que un 50% de las moléculas de DPPH perdieran su electrón desapareado al cabo de tan sólo 2 minutos. Como la cinética es muy importante en la reacción, nunca sería necesario este valor tan alto para producir una captación de radical DPPH al cabo de 30 minutos.

A la vista de estos resultados e independientemente de las medidas de contenido en polifenoles totales, que mostraron bastante variabilidad, se decidió proceder con el secado a baja temperatura,

#### 4. Influencia de factores operacionales.

fijándola en 35 °C. El efecto importante de la temperatura sobre la actividad antioxidante también se había observado durante la extracción acuosa asistida por ultrasonidos (Sineiro et al. 2014), donde la actividad se reduce considerablemente si se establecen temperaturas superiores a 40 °C al final del proceso.

#### 4.4. *BIFURCARIA BIFURCATA*

Los resultados obtenidos respecto a actividad antioxidante obtenidos para las fracciones F1 y F2 de *Bifurcaria bifurcata* secada a 35 °C se muestran en la Figura 4.11.

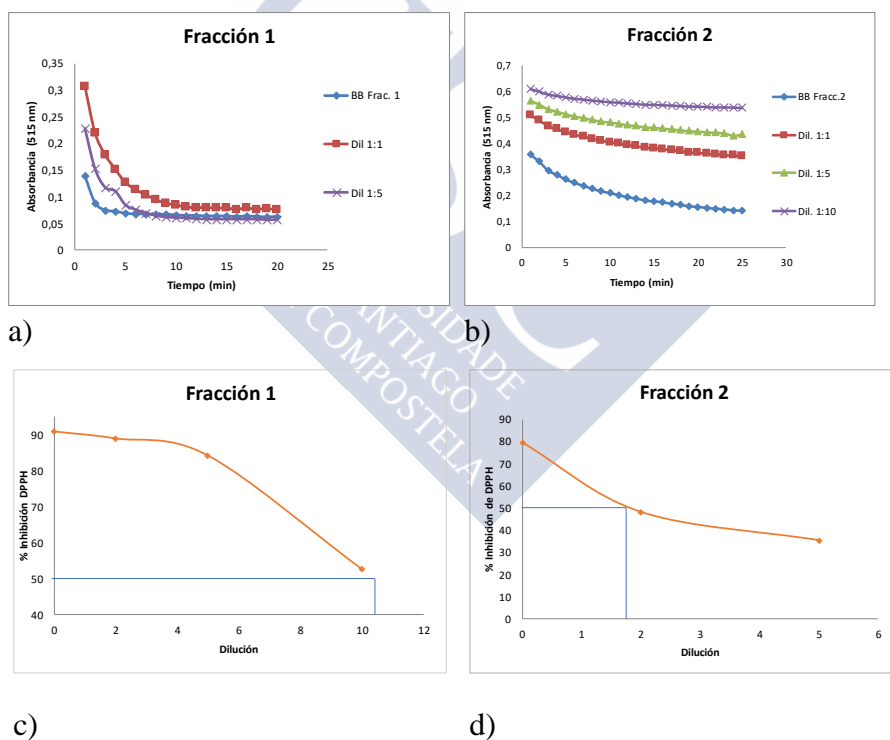


Figura 4.11 Inhibición de DPPH fracciones F1 y F2 de *Bifurcaria bifurcata* secada a 35 °C (a,b), evolución y estimación de diluciones para alcanzar el IC<sub>50</sub> de la Fracción 1 (c) y Fracción 2 (d).

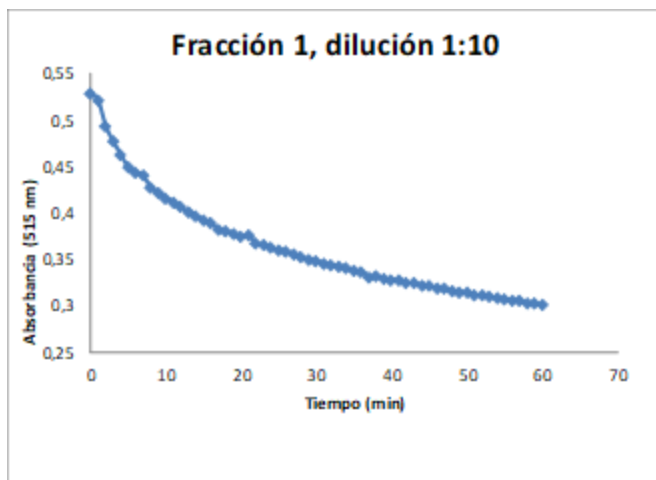


Figura 4.12 Evolución de la absorbancia de DPPH con el tiempo provocada por la fracción obtenida a partir de *Bifurcaria bifurcata* estandarizada a 50 mg liofilizado/L

La fracción F1 resultó la de mayor actividad de todos los ensayos tanto con *Fucus vesiculosus* como con *Bifurcaria bifurcata*, resultando un IC<sub>50</sub> de 14,3 mg/L (Tabla 4-4).

Tabla 4-4 Contenido en polifenoles totales (PT) de extractos acuosos de *Bifurcaria bifurcata*, actividad antioxidante como captación de radical DPPH y valores de FRAP y TEAC a 500 mM.

	Fracción 1	Fracción 2
PT en extracto líquido(mg eq. de floroglucinol/L) recogido de la columna	Media ± SD: 3755 ± 851	Media ± SD: 783 ± 13
<i>Bifurcaria bifurcata</i> IC <sub>50</sub> (mg eq. de liofilizado/mmol DPPH)	Media: 14,35 ± 5	Media: 90,0 ± 7.5
IC <sub>50</sub> (mg eq de floroglucino/mmol DPPH)	Media ± SD: 108 ±10	Media ± SD: 141 ± 12
FRAP (mM)	Media ± SD: 2.89 ± 0.61	Media± SD: 1.349 ± 0.15
TEAC (Mm)	Media ± SD: 2,40 ± 0,27	Media ± SD: 3,1 ± 0,12

#### 4. Influencia de factores operacionales.

Con relación al contenido en polifenoles, el rendimiento obtenido en el caso de *Bifurcaria bifurcata* fue mayor que el obtenido en *Fucus vesiculosus* (Figura 4.13).

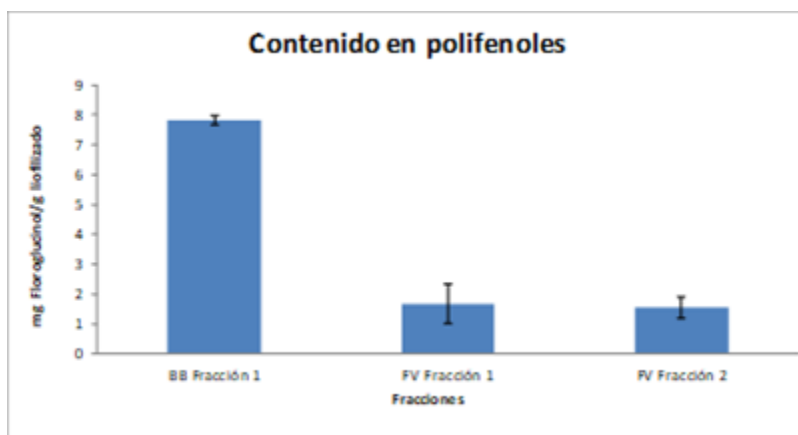


Figura 4.13 Rendimiento en polifenoles de las fracciones obtenidas de *Fucus vesiculosus* y *Bifurcaria bifurcata* tras secado a 35 °C por gramo de material liofilizado.



A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the slide. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

## **5. FRACCIONAMIENTO** **DE FLOROTANINOS**





## 5. FRACCIONAMIENTO DE FLOROTANINOS

### 5.1. INTRODUCCIÓN

El proceso general de obtención de polifenoles implica una primera etapa de extracción seguida de una etapa de separación. Tras separar los compuestos fenólicos mediante diferentes técnicas de fraccionamiento, se puede proceder a su identificación mediante técnicas como la espectrometría de masas asociada a la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-MS).

El proceso de extracción se considera un paso determinante en la obtención de compuestos fenólicos ya que repercute directamente en su rendimiento. La eficiencia de la extracción depende de varios factores como son la metodología de extracción, la elección del disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y el pH (Kyung et al. 2015).

La metodología habitual para la extracción de polifenoles implica una extracción sólido-líquido. Para ello es necesario controlar diversos parámetros.

La relación entre el sólido y el líquido es un parámetro importante que ha sido muy estudiado por diversos autores. Investigadores como (Radojkovi et al. 2012), basándose en los principios de transferencia de materia, demostraron que cuanto mayor es la relación entre estos mayor es el rendimiento de la extracción.

Otro de los parámetros importantes a la hora de llevar a cabo la extracción es la elección de la temperatura de extracción. Estudios llevados a cabo por autores como Li et al. 2017 utilizando diferentes temperaturas de extracción, demostraron que el aumento de temperatura de 15 a 25 °C provoca un aumento del contenido de polifenoles presentes en la macroalga *Sargassum fusiforme*. Por el contrario, al aumentar la temperatura hasta los 55°C se observó una disminución en el contenido de polifenoles totales. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta que elevadas temperaturas durante el

proceso de extracción pueden provocar un deterioro de los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

En cuanto al tiempo de extracción, se debe establecer teniendo en cuenta que un tiempo de extracción prolongado puede provocar un deterioro de la estructura de los polifenoles debido a una mayor exposición a la luz y al oxígeno, además de un incremento en los costes de la extracción (Tay et al. 2014).

Además de todos estos factores, también es importante llevar a cabo una adecuada prevención de la oxidación. Este aspecto se considera crucial para la posterior separación de los compuestos polifenólicos. Uno de los métodos utilizados, se basa en la transformación de los compuestos polifenólicos en sus derivados acetilados. No obstante, esta metodología debe evitarse si se busca mantener la estructura natural de los polifenoles (Koivikko et al. 2007).

En cuanto al disolvente empleado para llevar a cabo la extracción, muchos autores utilizan acetona, etanol y metanol acuoso (Koivikko et al. (2007) ; Parys et al. (2007), Li et al. (2017), Airanthi et al., (2011). De todos ellos, el metanol y la acetona acuosa han sido los que mejores resultados han arrojado a la hora de llevar a cabo la extracción de polifenoles. Cabe destacar las investigaciones llevadas a cabo por Koivikko et al. (2005) y Wang et al. (2012) en las que la extracción con acetona acuosa al 70% (v/v) mostró los mejores resultados.

Investigaciones más recientes se han centrado en la extracción de florotaninos a través de ultrasonidos utilizando para ello agua (Agregán et al. 2017a) o etanol presurizados (Montero et al. 2016). Cabe mencionar que la mayoría de las publicaciones relacionadas con la obtención de extractos para formulaciones de alimentos utilizan agua por motivos toxicológicos, económicos y medioambientales (Agregán et al. 2017b).

En este capítulo se describen dos metodologías diferentes para la obtención de polifenoles presentes en *Bifurcaria bifurcata*. En primer lugar, se llevó a cabo el fraccionamiento de las fracciones obtenidas mediante la extracción con acetona al 70 %. Por otro lado, se realizó una extracción asistida por ultrasonido utilizando agua.

Posteriormente, se llevaron a cabo diferentes técnicas de identificación con el objetivo de elucidar las diferentes fracciones obtenidas en ambas metodologías.

### **5.1.1. Fraccionamiento mediante cromatografía semi-preparativa**

Con el objetivo de llevar a cabo una mayor separación de los compuestos polifenólicos presentes, se efectuó la separación cromatográfica mediante cromatografía semi-preparativa.

La muestra resultante con un tamaño inferior a los 3 kDa se sometió a análisis de HPLC con un sistema HPLC (Jasco, Tokio, Japón) equipado con una bomba PU-980 y un detector UV-1575 controlado por el software PowerChrom 2.5 (eDaq Technologies, Australia) con el cual se llevó a cabo el registro de los datos. Para la separación cromatográfica se utilizó la columna semipreparativa Kromasil C-18 (8 mm x 250 mm) con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . La temperatura establecida para la columna fue de 30°C. El método practicado resultó de una adaptación de estudios previos (Wang\_2008, Koivikko et al., 2007). Para la cromatografía semipreparativa, se empleó un gradiente de elución en tres pasos, cuya fase móvil consistió en una mezcla de (A) agua de grado HPLC (Panreac, España) y (B) etanol de grado HPLC (Panreac, España). La fase móvil se filtró a través de un filtro de membrana de poliamida con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Alemania) y se desgaseificó en un baño de ultrasonidos (S40H, Elmasonic, Alemania) antes de suministrarlo al sistema del HPLC.

El volumen de inyección de la muestra fue de 500  $\mu\text{L}$  y la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 266 nm. La velocidad de flujo del disolvente se ajustó a 1,2 mL/h. La elución en gradiente fue: 0-30 min (99% A, 1% B), 30-32 min (5% A, 95% B), 32-40 (99% A, 1% B).

Las fracciones se eluyeron de la columna y se recolectaron mediante un colector de fracciones (2110, Bio-Rad, EE. UU.) en tubos de 7 mL de volumen. La identificación de las fracciones se llevó a cabo a partir del análisis de los tiempos de retención presentes en el cromatograma. Luego se juntaron los tubos pertenecientes a la misma

fracción y se concentraron en un rotavapor (R-114, Büchi, EE. UU) equipado con un baño de agua (B-480) a temperatura de 40 °C.

Con el fin de determinar la reproducibilidad del ensayo y obtener una cantidad suficiente de las fracciones mayoritarias, se realizaron varias inyecciones de la misma muestra. Estas inyecciones corresponden a los *runs* 51-58 procedentes de la muestra denominada como BB5.

Posteriormente, se determinó la concentración de polifenoles de las diferentes fracciones F9, F14, F32 y F37. La concentración de polifenoles de cada fracción se calculó como equivalentes de floroglucinol integrando el área de su correspondiente pico y se refirió a una calibración estándar. La concentración ( $\mu\text{M}$ ) para cada una de las fracciones obtenidas en los *runs* 51-58 se muestra en la Tabla 5-1.

**Tabla 5-1. Concentración ( $\mu\text{M}$ ) de las fracciones F9 (t=9 min), F14 (t= 14 min), F32 (t=32 min) y F37 (t= 37 min) recolectadas en los *runs* 51-58.**

<i>RUNS</i>	t= 9 min	t= 14 min	t= 32 min	t= 37 min
51	13,2	4,7	10,5	16,3
52	15,4	6,8	9,2	18,9
53	18,8	4,3	8,6	18,6
54	14,4	6,0	12,3	21,0
55	14,0	5,0	11,8	20,8
56	16,2	6,1	11,1	19,8
57	0	7,7	13,0	21,5
58	16,9	8,4	12,4	23,2
Total ( $\mu\text{M}$ )	109,1	48,9	89,0	160,3

Teniendo en cuenta el volumen total obtenido de cada fracción y el volumen final una vez concentrada cada una de las fracciones se procedió al recálculo de las concentraciones de cada una de las fracciones (Tabla 5-2).

**Tabla 5-2. Volumen total obtenido de cada una de las fracciones (volumen inicial), el volumen después de concentrar en el rotavapor (volumen final) así como la concentración final ( $\mu\text{M}$ ) recalculada para cada una de las fracciones.**

Fracción	t= 9 min	t=14 min	t= 32 min	t= 37 min
Volumen inicial (ml)	12,0	12,0	17,0	18,0
Volumen final (ml)	1,0	1,2	0,93	0,9
Concentración final ( $\mu\text{M}$ )	1309,3	488,2	1635,7	2931,2

### 5.1.2. Determinación de contenido fenólico total

Con el objetivo de determinar el contenido de polifenoles totales de las fracciones poliméricas obtenidas, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

Para ello se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de una de las fracciones (BB5) previamente disueltas en metanol, y se depositaron en tubos de vidrio. A continuación, se les añadió 2500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu seguido de 2000  $\mu\text{L}$  de reactivo de carbonato de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se incubó en una incubadora de baño a 37°C durante 30 minutos. El procedimiento se realizó por triplicado. Transcurrido dicho tiempo se sacaron del baño y se dejaron a temperatura ambiente observando una intensa coloración azul producto de reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Dicha coloración azul se puede observar en la Figura 5.1 donde se aprecia a la izquierda una serie de tubos cuyo intenso color azul es producto de la reacción de los polifenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu y a la derecha se muestra el control.



Figura 5.1 Tubos de ensayo con polifenoles (izquierda) y tubo control (derecha).

Posteriormente, se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a 765 nm en un espectrómetro. La estimación de polifenoles totales se estimó a partir de una curva de calibración de floroglucinol como estándar. El contenido fenólico se expresó como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de floroglucinol (EPG) por mg de polvo seco (Tabla 5-3).

### 5.1.3. Análisis estructural mediante HPLC-MS y HPLC-DAD.

La caracterización de los florotaninos es un proceso que requiere de la utilización de diversas técnicas. Generalmente, es necesario combinar técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con técnicas de espectrometría de masas (MS) y otras técnicas como técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Catarino et al.(2017)).

La cromatografía líquida alta resolución asociada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) ha demostrado ser una herramienta de gran valor para el análisis de los compuestos polifenólicos (Agregán et al. (2017). Mediante esta técnica, diversos autores han logrado identificar diferentes compuestos polifenólicos presentes en algas (Li et al. 2017; Martínez y Castañeda, 2013).

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta resolución asociada a la detección ultravioleta (HPLC-UV) también ha sido comúnmente utilizada por otros autores para llevar a cabo la identificación de

compuestos polifenólicos debido a su menor coste y a su facilidad para realizar análisis rutinarios (Kyung et al. 2015).

Con la finalidad de llevar a cabo la identificación de las fracciones de polifenoles se optó por utilizar en primer lugar la cromatografía líquida de alto rendimiento asociada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) y en segundo lugar se eligió la cromatografía líquida de alto rendimiento asociada a la radiación UV, utilizando un detector diodo *array* (HPLC-DAD).

El sistema elegido para llevar a cabo el análisis empleando la técnica HPLC-MS fue el equipo AB Sciex QTrap-MS-MS, dotado de una fuente de ionización por *electrospray*. El análisis se desarrolló en detección de modo de ion positivo en un rango de masa de 200-15000 m/z. La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa (Kromasil 100 C18 25 x 0,46 mm, 5  $\mu$ m, Scharlab, SL, España) manteniendo una temperatura de columna de 30 °C. La fase móvil consistía en (A) agua grado HPLC (Panreac, España) y (B) etanol de grado HPLC (Panreac, España). La elución en gradiente fue: 0-30 min (99 % A, 1% B), 30-32 min (5 % A, 95 % B), 32-40 (99 % A, 1% B). El volumen de inyección de la muestra fue de 20  $\mu$ L y la velocidad de flujo se ajustó a 0,7 mL/min. Para el registro de los datos se usaron los programas Analyst 1.6 y MestReNova 12.0.1 (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, España).

Por otro lado, se llevó a cabo la cromatografía líquida de alta resolución HPLC-DAD mediante un equipo de HPLC Agilent (1100, Agilent, EE. UU.) equipado con un detector de *array* de fotodiodo (DAD). El sistema cromatográfico y las condiciones fueron las mismas que se aplicaron en la obtención semipreparativa de las fracciones, utilizando en este caso una columna Kromasil C18 5 (4,6x250 mm) a una tasa de flujo de 0,7 mL/min. El registro del cromatograma ultravioleta se llevó a cabo a una longitud de onda de 266 nm y 330 nm, por lo que todo el espectro UV está en el rango comprendido entre 200 y 400 nm. La adquisición de datos se realizó con el software HP Chemstations y el análisis de datos con la ayuda del software MestReNova 12.0.1.

### 5.1.4. Resultados

El contenido total de polifenoles de la fracción BB5 fue de  $19,56 \pm 0,001$   $\mu\text{g}$  de EPG/mg de muestra (Tabla 5-3).

**Tabla 5-3 Contenido total de polifenoles de la fracción polimérica BB5. EPG: Equivalentes en floroglucinol.**

Concentración (mg / mL)	mg EPG	mg EPG/ mg muestra	$\mu\text{g}$ EPG/ mg muestra
234,54	2,3	0,02	19,5
249,54	2,5	0,02	20,8
220,09	2,2	0,02	18,3

Esta fracción se sometió a un fraccionamiento adicional mediante HPLC semipreparativa obteniendo cuatro fracciones principales enriquecidas con florotaninos. Dichas fracciones se obtuvieron a los tiempos de retención de 9, 14, 32 y 37 minutos y se denominaron como F9, F14, F32 y F37 respectivamente.

La Figura 5.2 muestra el perfil cromatográfico obtenido en el que se diferencian las cuatro fracciones principales. La separación cromatográfica se llevó a cabo durante más de 45 minutos para asegurarse de que no se detectaban compuestos polifenólicos fuera de este rango. Se realizaron múltiples pinchazos y en todos ellos se observó un perfil de elución idéntico. Esta reproducibilidad es indicativa de que los polifenoles se mantienen estables en los disolventes de elución empleados, sugiriendo que la metodología HPLC utilizada proporcionó una separación adecuada de los polifenoles presentes en *Bifurcaria bifurcata*.



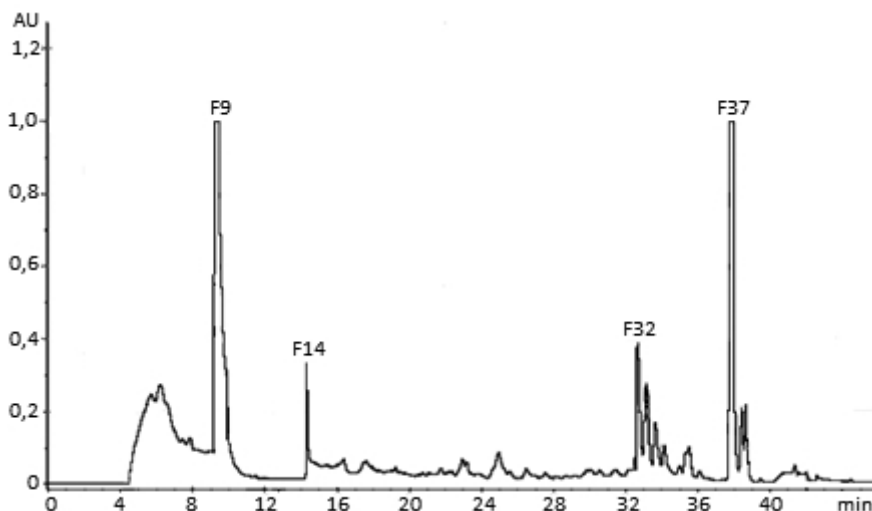


Figura 5.2. Cromatograma de las fracciones fenólicas de *Bifurcaria bifurcata* detectados a 266 nm mediante RP-HPLC.

A partir de los resultados de los espectros DAD y MS obtenidos por HPLC-MS se llevó a cabo un análisis de los patrones de fragmentación, así como de los aductos formados en modo ion positivo. Comparando dichos resultados con los presentes en la literatura se llevó a cabo la elucidación del tamaño promedio de las fracciones fenólicas F9, F14, F32 y F37.

El análisis de los fragmentos obtenidos en las fracciones mostró la existencia de una serie de fragmentos comunes a todas ellas.

Dichos fragmentos se resumen en la Tabla 5-4 . Además, existe una serie de fragmentos cuya presencia es mayoritaria en todas las fracciones.

**Tabla 5-4 Fragmentos comunes a todas las fracciones obtenidas por HPLC-MS con fragmentación en modo ión positivo. En negrita se muestran los fragmentos mayoritarios.**

Fragmento(m/z)	Estructura identificada
111	Fragmento residuo de floroglucinol -“O”
<b>127</b>	Floroglucinol protonado
140	Fragment tetrahidroxibenceno: fuhaloles, floretoles
<b>163</b>	Fragmento aducto (m/z= 140) + Na
173	Aducto de agua de un residuo tetrahidroxilado
<b>234</b>	Bifuhalol con “O” de una pérdida de un enlace éter
319-320	Aductos de H <sub>2</sub> O y Na de fuhaloles diméricos o fracciones de floretoles.
<b>629</b>	Fragmento pentámero de floretoles o polihidroxifuhaloles
<b>851</b>	Fragmento heptámero de floretoles o polihidroxifuhalol

A continuación, se muestran una serie de figuras correspondientes a los patrones de fragmentación de las diferentes fracciones a determinados tiempos de residencia.

La Figura 5.3 muestra el patrón de fragmentación como cromatograma de iones total (TIC) de la fracción F14, que corresponde entre los tiempos de residencia de 15,7 y 15,9 minutos. Entre estos tiempos, el perfil apenas cambia mostrando las mismas

señales, que difieren solo en la intensidad relativa de los fragmentos intermedios.

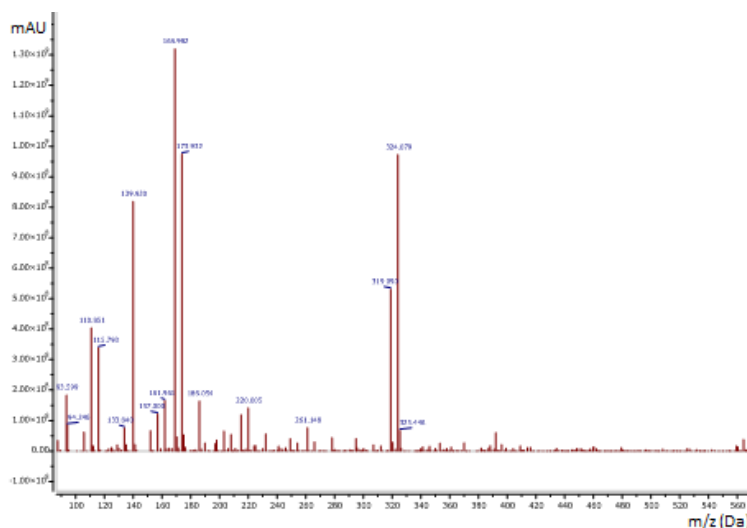


Figura 5.3 Cromatograma de iones total (TIC) de la fracción F14 mostrando un patrón de fragmentación de un tetramero identificado como fuhalol.

Tras el análisis de los fragmentos más abundantes presentes en la fracción F14 se extrajeron una serie de conclusiones. La preponderancia del fragmento a  $m/z$  140 y 141 (fragmento iónico derivado de tetrahydroxibenceno), junto con el fragmento a  $m/z$  110 (fragmento iónico derivado de dihydroxibenceno) y el fragmento a  $m/z$  162 (aducto de sodio a partir de un fragmento de  $m/z$  140), indica que estos fragmentos son principalmente fuhaloles o floroetoles, previamente descritos en *Bifurcaria bifurcata* por (Glombitza et al, 1976). Sin embargo, el fragmento a  $m/z$  157, que involucra cinco átomos de oxígeno alrededor de un anillo C6, no será relevante en los floroetoles, por lo que puede estar formado por polohydroxyfuhaloles no lineales. El patrón de fragmentación indica que el componente es más parecido a un hidroxitetrafuhalol o tetrafuhalol B ( $C_{24}O_{14}H_{18}$ ),

con un tamaño molecular de  $MW = 530$ , como ha sido descrito previamente por Parys et al. 2007, en referencia a la publicación de Ragan and Glomblitza, 1986. El patrón de ruptura compatible con todas las señales encontradas en el espectro de masas se muestra en la Figura 5.4.

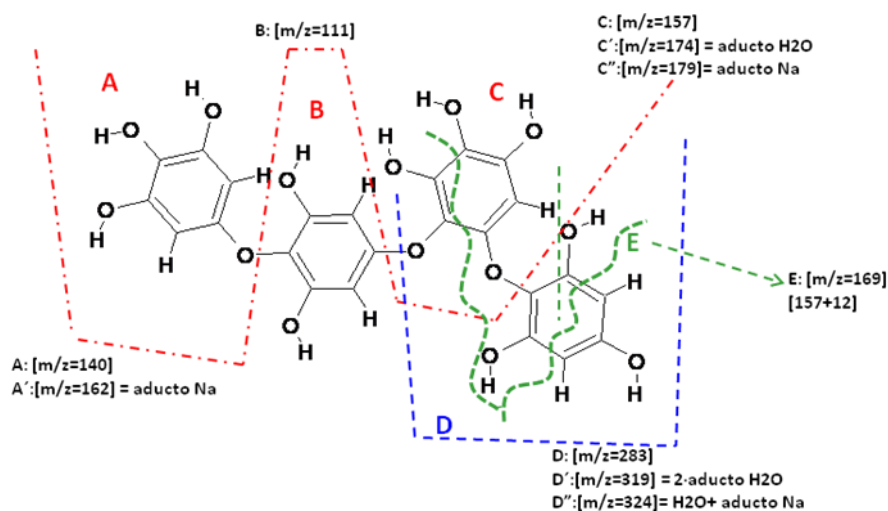


Figura 5.4. Esquema del patrón de fragmentación del tetrafulalol B ( $C_{24}H_{14}O_{18}$ ) descrito por Ganard & Gomblitza (1986) mostrando la distribución de los fragmentos de masa obtenidos por HPLC-ESI-MS así como la abundancia obtenida de la fracción F14.

Esta molécula se puede reconstruir en un software de modelado molecular (ChemSketch, ACD/Labs Inc.). La estructura 3D optimizada (Figura 5.5) y los parámetros calculados son los siguientes.

- Fórmula:  $C_{24}H_{18}O_{14}$ .
- Peso molecular: 530,39.
- Composición: C (54.35%), H(3.42%), O(42.23%).
- Refractividad molar:  $126,28 \pm 0.3 \text{ cm}^3$ .
- Volumen molar:  $284 \pm 3 \text{ cm}^3$ .
- Coeficiente Parachor:  $946 \pm 4 \text{ cm}^3$ .
- Índice de refracción:  $1,844 \pm 0.02$
- Densidad:  $1.868 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$ .

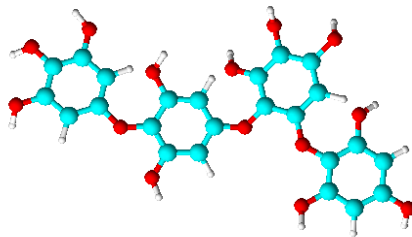


Figura 5.5. Estructura 3D optimizada mediante el software Chemscketch.

En cuanto a las fracciones F32 y F37, los resultados obtenidos muestran que se trata de componentes de naturaleza similar, siendo identificados como polifuhaholes. Cómo se puede observar en las siguientes figuras, las fracciones F32 y F37 muestran un patrón de fragmentación similar. Entre los fragmentos obtenidos para estas fracciones se encontraron fragmentos principales cuyo  $m/z$  correspondía a  $m/z = 110, 141$  y  $319$ . Las diferencias vienen dadas en cuanto al tamaño de los fragmentos de masas. La fracción F32 (Figura 5.6) muestra un máximo de fragmentos de masa de  $629 \text{ m/z}$  (pentámeros de polihidroxifuhalol) mientras que la fracción F37 presenta fragmentos mayores con una relación de  $923 \text{ m/z}$  (

Figura 5.7) con un grado de polimerización de 7. El patrón de fragmentación también es similar y fragmentos inferiores corresponden con los observados en la fracción F14, con un tamaño molecular más bajo.

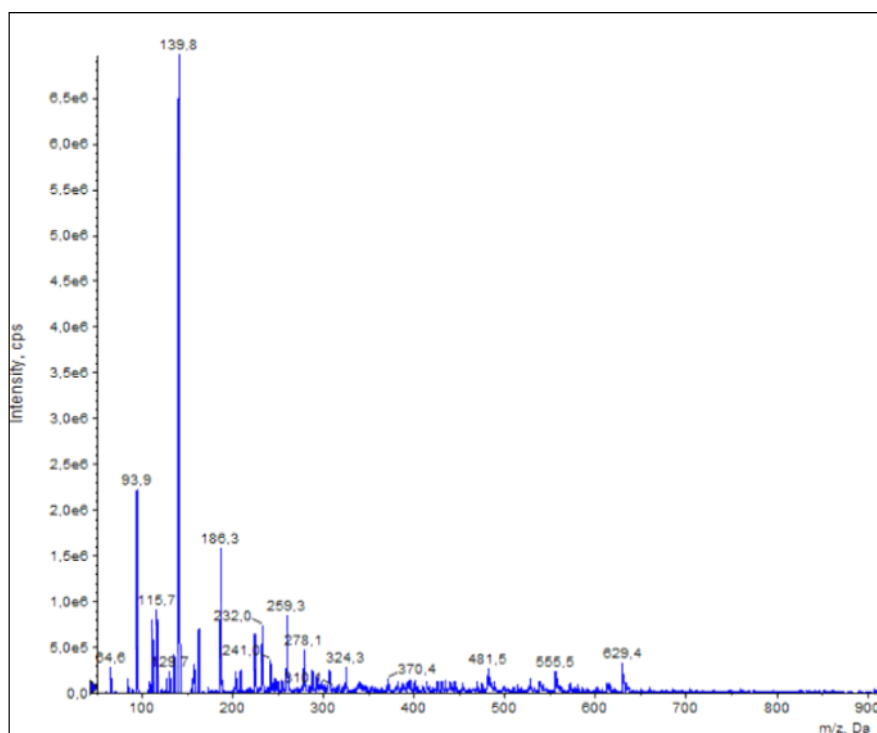


Figura 5.6. Perfil obtenido para la F32 cuyo  $m/z$  corresponde a 629  $m/z$ .

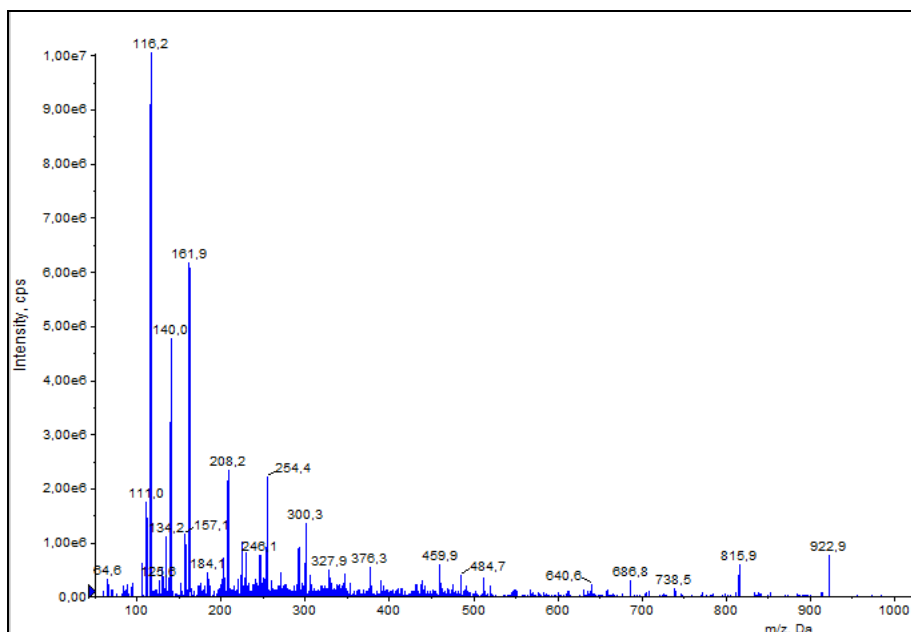


Figura 5.7. Perfil obtenido de la fracción F37 con un peso molecular de 922 m/z.

Considerando trabajos previos (Montero et al. 2016), se encontraron series de fragmentación coincidentes con las halladas para las fracciones F32 y F37 lo que hace postular que los principales compuestos de dichas fracciones son hidroxipentafuhalol y dihidroxiocetafuhalol respectivamente.

Cabe destacar, la similitud encontrada entre la secuencia de masas de la fracción F32 con la descrita por los autores Li et al 2017 para los fuhaloles pertenecientes a *Sargassum* sp. En el presente estudio se encontraron series de fragmentación con alta intensidad cuyas relaciones m/z coinciden con las publicadas por Li et al.2017 (m/z = 111, 140, 547 (grado de polimerización 4), 667 (grado de polimerización 5), 777 (grado de polimerización 6) correspondientes a polihidroxifuhaloles.

Gracias a los espectros UV obtenidos por HPLC-DAD, y mediante su comparación con los espectros del estándar de floroglucinol junto a los datos disponibles en la literatura; las fracciones se identificaron como derivados de floroglucinol. Como ya se mencionó anteriormente las muestras F32 y F37 fueron similares en el patrón de fragmentación y también fueron similares en el perfil del espectro UV. La diferencia entre las fracciones F32 y F37 está en dos picos principales que representan el 40% del área total. Estos picos corresponden, por un lado, a los picos que aparecen a 26,89 minutos y 27,25 minutos en la fracción F32 (Figura 5.8).

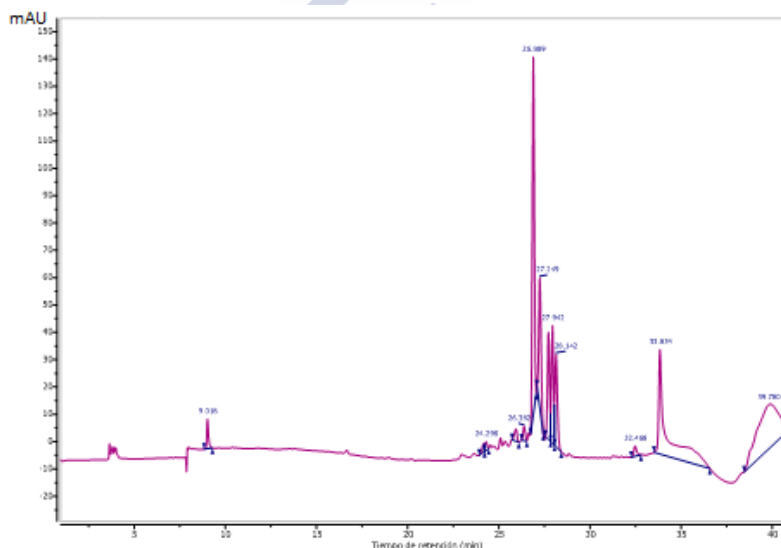


Figura 5.8. Cromatograma de la fracción F32 a una longitud de onda de 266 nm.



## 5. Fraccionamiento de florotaninos.

En cuanto a la fracción F37, ese pico corresponde al pico que aparece a 30,94 minutos (Figura 5.9)

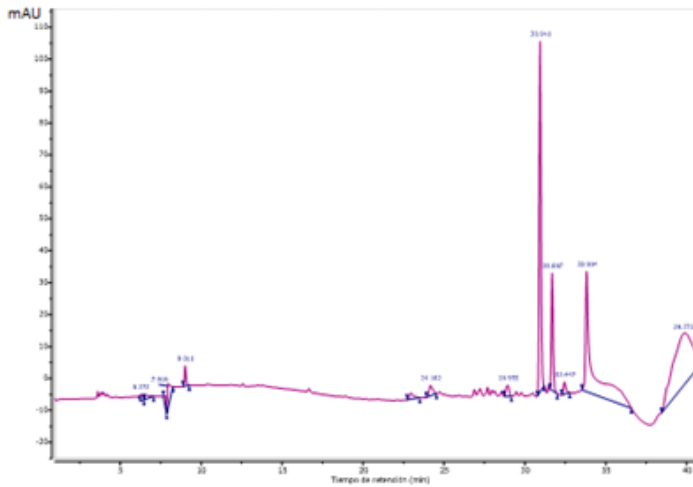


Figura 5.9

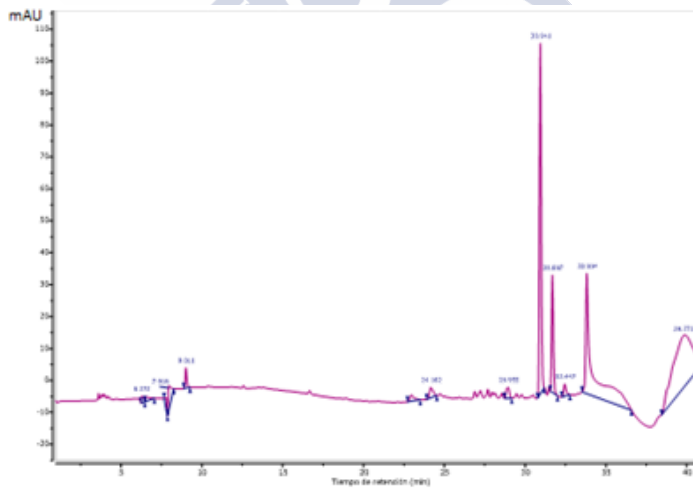


Figura 5.9 Cromatograma de la fracción F37 a una longitud de onda de 266 nm.

Cabe destacar que estos picos no absorben a 267 nm. En cambio, tanto la fracción F32 como la fracción F37 presentaron un pico que absorbe a 242 nm (Figura 5.10 y Figura 5.11).

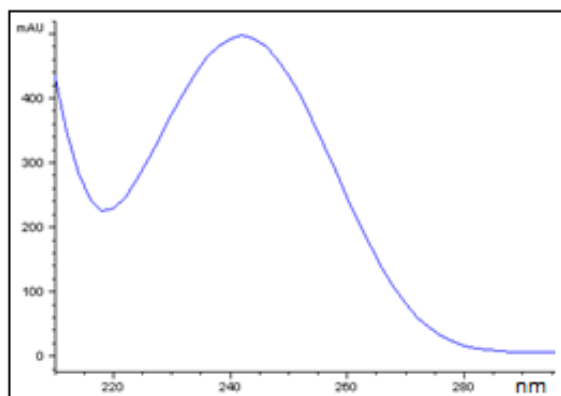


Figura 5.10. Espectro UV de un pico desconocido en la fracción F32 a  $t=25,9$  minutos.

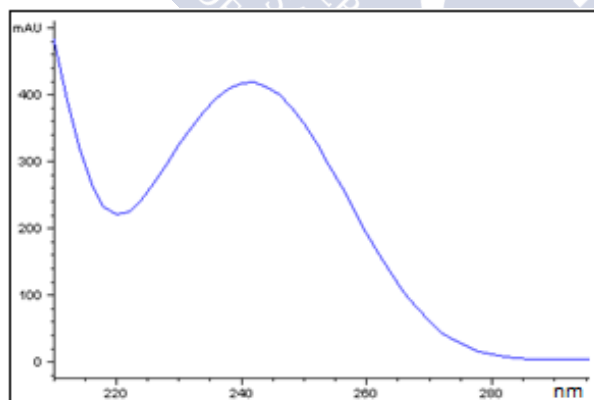


Figura 5.11. Espectro UV de un pico desconocido de la fracción F37 a  $t=29,9$  min.

Los componentes en este pico permanecen desconocidos, pero es destacable el hecho de que aparezcan tanto en la fracción F32 como en

## 5. Fraccionamiento de florotaninos.

la fracción F37 en tiempos de retención significativamente diferentes (26,89 y 27,25 minutos en F32 vs. 30,94 minutos en F37). No obstante, presentan la misma demora respecto a los picos que muestra el espectro UV del tipo de florotanino, con absorbancias máximas a 270 nm, tal y como se puede observar en la Figura 5.12, Figura 5.13, Figura 5.14 y Figura 5.15.

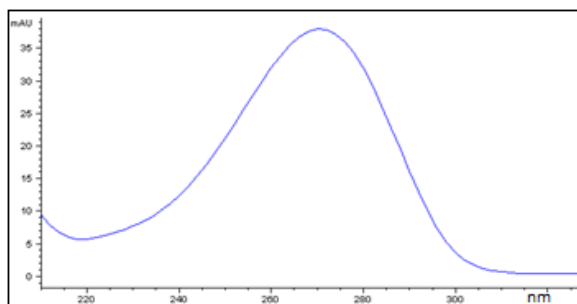


Figura 5.12. Espectro UV de un componente florotanino minoritario en la fracción F32 (pico a  $t=27,1$  minutos).

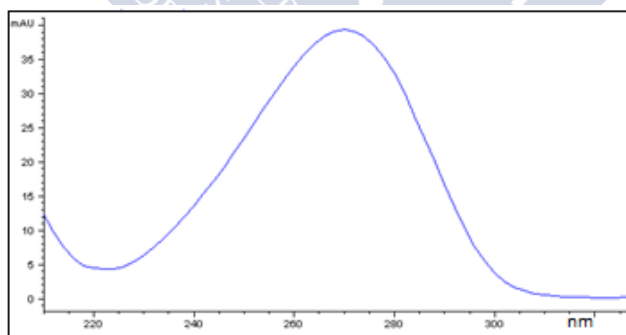


Figura 5.13. Espectro UV de un componente florotanino minoritario en la fracción F37 (Pico a  $t= 30,9$  minutos)

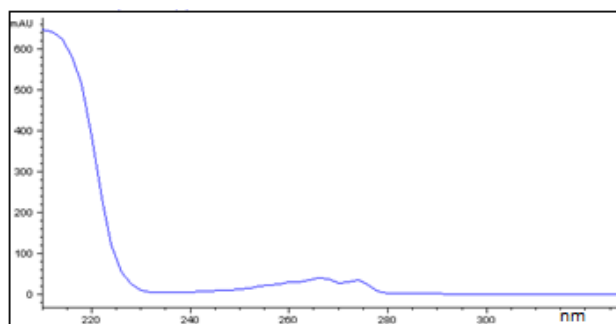


Figura 5.14. Espectro UV de un componente florotanino mayoritario en F32 (Pico a 32,8 minutos).

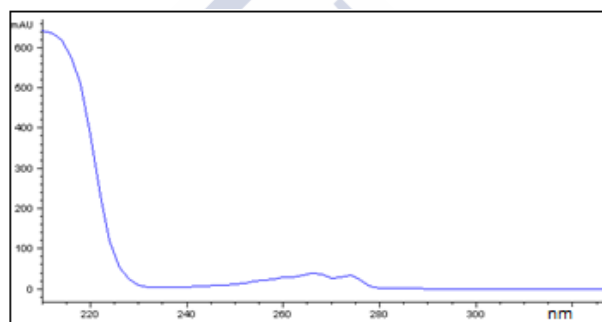


Figura 5.15. Espectro UV de un componente florotanino mayoritario en F37 (Pico a  $t=32,8$  minutos).

## 5. Fraccionamiento de florotaninos.

Teniendo en cuenta que estas sustancias en las fracciones F32 y F37 mostraron patrones de fragmentación similares (datos no mostrados) y que sus respectivos tiempos de retención fueron diferentes en un valor similar que el retraso entre los otros picos (4 min), esto sugiere que estos componentes podrían derivarse de florotaninos o deberían estar vinculados a ellos. La explicación más probable es que son productos de la oxidación parcial de los florotaninos. A pesar de que las hidroxiquinonas simples generalmente muestran picos UV entre 270 y 280 nm, los fenoles totalmente oxidados, como la 1,4-benzoquinona, muestran máximos de absorción entre 240 y 250 nm en solventes orgánicos (

Figura 5.16) (Ahmed y Khan 2000).

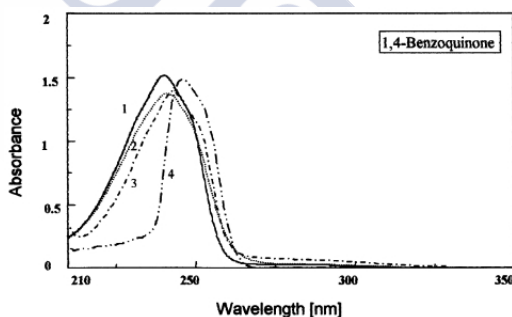


Figura 5.16 Espectro UV de la 1,4-Benzoquinona en iso-octano(1), ciclohexano(2), 1,4dioxano(3) y cloroformo(4). (Ahmed y Khan, 2000).

## **5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE FLOROTANINOS DE BB MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA.**

La extracción de fracciones de florotaninos utilizando agua como disolvente se realizó con el objetivo de comparar dicho perfil con el obtenido previamente a partir de la extracción con acetona al 70 %.

Al tratarse de una extracción acuosa, se obtendrán florotaninos solubles en agua. Por lo tanto, se espera obtener fracciones diferentes a las obtenidas anteriormente. En principio serán florotaninos menos poliméricos y con menor cantidad de fracciones fenólicas.

Para ello se preparó el extracto acuoso de BB, seguido de la extracción asistida por ultrasonido y la posterior separación cromatográfica mediante HPLC-RP.

### **5.2.1. Preparación del extracto**

A partir de polvo seco de *Bifurcaria Bifurcata* procedente de Portomuiños (9/11/2014), se preparó de 1L de extracto acuoso necesario para poder llevar a cabo la extracción en el ultrasonificador. Con el objetivo de obtener un buen rendimiento en la extracción y una buena solubilidad, se guardó una relación sólido: líquido del 30 %. El procedimiento llevado a cabo se detalla a continuación. Se tomó un vaso de precipitados de 1L, se enrasó con agua destilada y se colocó sobre una placa agitadora con un imán en su interior. A continuación, se pesaron 33,3 g de *Bifurcaria bifurcata* y se añadieron poco a poco a dicho vaso de precipitados, que se mantuvo en agitación durante 10 minutos.

### **5.2.2. Extracción asistida por ultrasonido**

Para llevar a cabo la extracción de los polifenoles asistida por ultrasonidos se utilizó un ultrasonificador (Hielscher, UIP-1000 hdT, Germany) conectado a una bomba peristáltica. Durante todo el proceso de extracción se controló la temperatura colocando el vaso de precipitados que contenía el extracto acuoso sobre una placa termostatzada. La Figura 5.17 muestra el extracto acuoso de *Bifurcaria bifurcata* durante la extracción de fucoidano asistido por ultrasonidos. En la imagen también se muestra la bomba peristáltica

encargada de llevar a cabo el bombeo del extracto acuoso por todo el sistema del ultrasonificador.



Figura 5.17. Extracción acuosa asistida por ultrasonidos del extracto de BB.

El proceso de extracción se llevó a cabo bajo unas condiciones de temperatura de 37 °C durante 14 minutos. Las condiciones de operación del ultrasonido fueron una frecuencia de 20 kHz y el generador de ultrasonidos operó con un 90% de amplitud. La temperatura afecta a la solubilidad de los fenólicos y por lo tanto al rendimiento de extracción. En estudios previos, llevados a cabo por nuestro grupo se estableció como temperatura idónea 37 °C logrando obtener un rendimiento de extracción de 200 mg/mL.

Finalizada la extracción, se dejó enfriar la disolución a temperatura ambiente. A continuación, se filtró el volumen obtenido y se centrifugo a 9000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga. Finalmente se recuperó todo el sobrenadante, se filtró a través de membranas Amicon de 0,22 micras de diámetro obteniendo un extracto acuoso (Figura 5.18).



Figura 5.18. Extracto acuoso de BB tras filtrar por membranas amicon de 0.22 micras.

### 5.2.3. Separación cromatográfica mediante RP-HPLC

Para llevar a cabo la cromatografía líquida de fase reversa semipreparativa se utilizó el equipo Jasco utilizado anteriormente.

La columna utilizada fue una columna Supelcosil PL-18 (25 cm x 21.2 mm, con 12  $\mu\text{m}$  de diámetro). La fase móvil consistió en A) agua calidad HPLC y B) etanol calidad HPLC. El gradiente de elución consistió en 0-3 min (99 % A, 1 % B), 3-84,51min (5 % A, 95 % B), 84,51-93,13 (99 % A, 1 % B), 90,13-112,60 min (99 % A, 1 % B).

Se procedió a realizar la inyección de 5 mL de extracto de BB obtenido en el paso anterior. El caudal para llevar a cabo la inyección del extracto fue de 0,3 mL/min. El procedimiento se llevó a cabo como se describe a continuación. Debido al tamaño del look, se llevaron a cabo 10 pinchazos de 500  $\mu\text{L}$  de volumen, con un intervalo de tiempo de 1 minuto 40 segundos entre pinchazos. El tiempo establecido entre pinchazos fue el tiempo necesario para que el volumen de 500  $\mu\text{L}$  atravesara el look y llegara a la columna, momento en el que se realiza otro pinchazo evitando así la separación cromatográfica entre los picos. Tras la inyección del extracto, se incrementó el caudal de trabajo a 2 mL/min y se inició el registro con el software PowerChrom. Las fracciones se colectaron en el colector en tubos de vidrio cuya capacidad era 7 mL.



Se llevaron a cabo múltiples pinchazos y las fracciones obtenidas se separaron debidamente en función del perfil cromatográfico obtenido. Las fracciones pertenecientes al mismo pinchazo se llevaron a concentrar en el rotavapor a 37 °C. Al mismo tiempo una alícuota de dichas fracciones se sometieron a un análisis del contenido en polifenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito anteriormente (ver epígrafe 2.1.1).

Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de espectrometría de masas asociado a ultravioleta (DAD). El método empleado se describe a continuación:

Los disolventes empleados fueron agua y etanol absoluto, ambos calidad HPLC. El gradiente de elución empleado fue el siguiente:

1. Condiciones iniciales: 99% de A, 1% de B
2. En 30 min: hasta 5% de A y 95 % de B
3. Hasta los 34 min: 99% de A, 1% de B

El flujo fue de 0.6 ml/min y se inyectó 20uL de muestra en el equipo. El espectro de masas se registró entre los 100-3000 Dalton.

Por otro lado, se llevó a cabo el análisis por espectroscopia infrarroja (FTIR). El espectro de masas se registro en el rango completo, de 200 a 4000 Da.

### 5.2.4. Resultados

Tras la separación cromatográfica se obtuvieron 2 fracciones claramente diferenciables en el siguiente cromatograma. (perteneciente al run 15) (Figura 5.19).

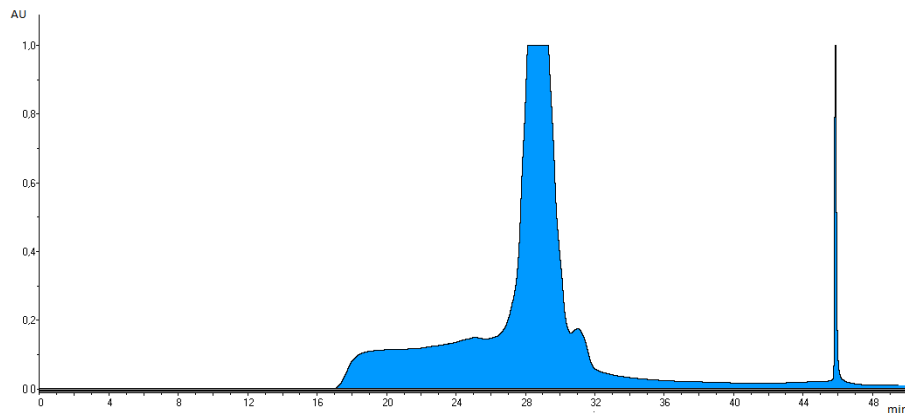


Figura 5.19. Perfil cromatográfico de las fracciones F2 (izquierda) y F3 (derecha).

Dichas fracciones fueron sometidas al análisis del contenido en polifenoles y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.3.

**Tabla 5-5 Concentración y mg recuperados de las fracciones F2 y F3.**  
**\*Concentración(uM) calculada a partir de equivalentes de floroglucinol.**

Fracciones	Concentración (mg/L)	mg recuperados	*Concentración (uM)
F2	285.01	0.28	2262
F3	10.02	0.01	79.52

A continuación, con el objetivo de conocer más los compuestos que forman parte de las fracciones F2 y F3, las fracciones se sometieron a espectrometría de masas (CACTUS de Lugo).

La Figura 5.20 muestra el espectro MS-Ms obtenido para la fracción F3 en el tiempo t=19,97 min, donde se puede apreciar que los

## 5. Fraccionamiento de florotaninos.

fragmentos más abundantes presentan  $m/z$  correspondientes a 115, 193, 289 y 542  $m/z$ . En cuanto a la fracción F2, se obtuvieron fragmentos más abundantes correspondientes a un  $m/z$  de 220, 337, 534 y 680  $m/z$ . Dichos fragmentos pueden observarse en la Figura 5.20.

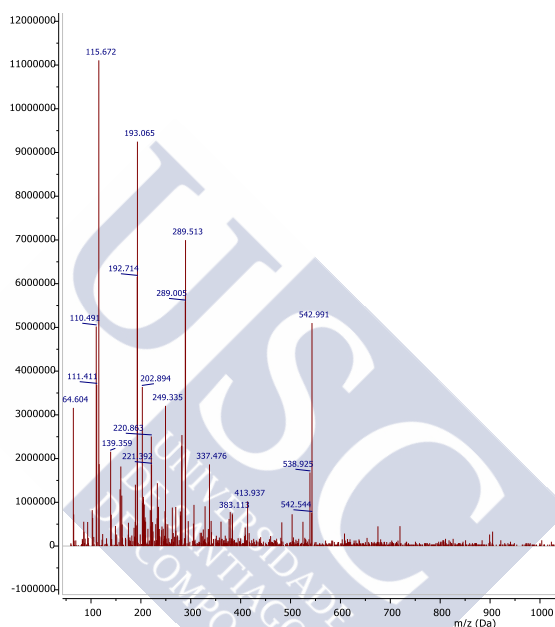


Figura 5.20 Espectro MS-MS de la fracción F3 en el tiempo  $t=19,97$  min.

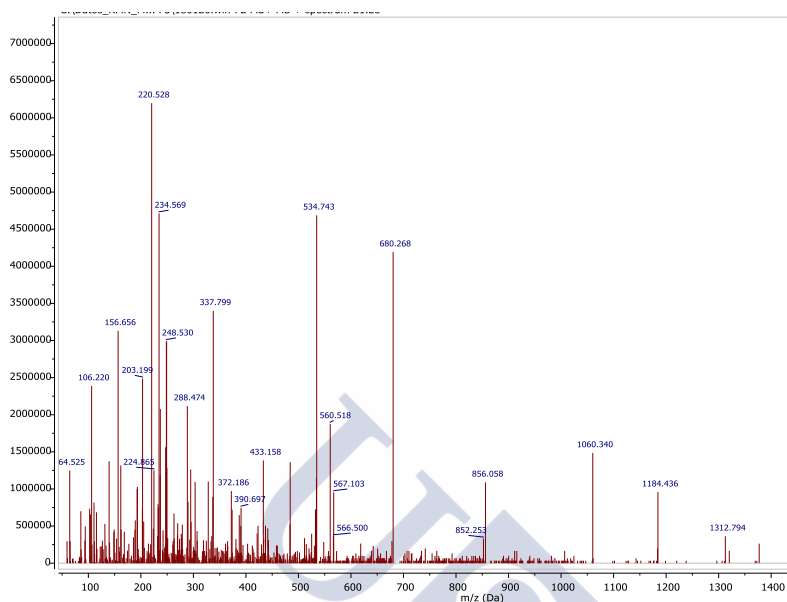


Figura 5.21 MS-MS de la fracción F3 en el tiempo  $t = 21,28$  min.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante HPLC-DAD se observó que las fracciones F2 y F3 presentaban diferente espectro DAD. Como muestra la Figura 5.22, la fracción F2 presenta una serie de picos en los minutos 4-5 que no están presentes en el caso de la fracción F3. A su vez la fracción F3 presenta unos picos a tiempo 24 y 36 minutos que no aparecen en el espectro HPLC-DAD de la fracción F2 (Figura 5.23).

5. Fraccionamiento de flortaninos.

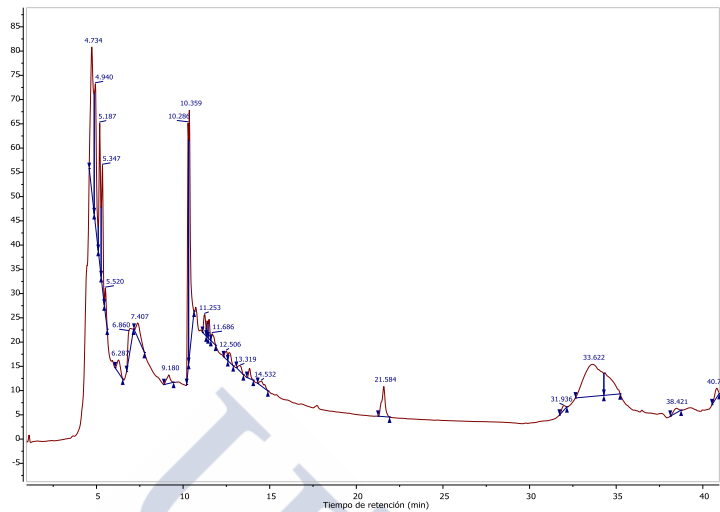


Figura 5.22 Espectro HPLC-DAD de la fracción F2.

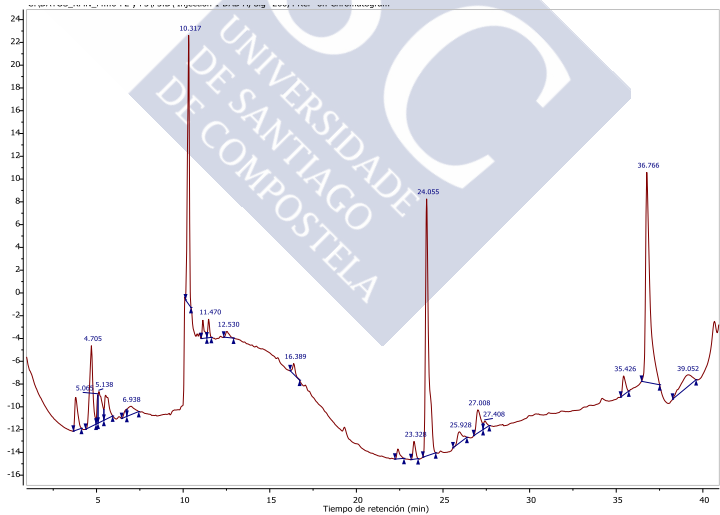


Figura 5.23 Espectro de la fracción F3.





## 6. FUCOIDANOS





## 6. FUCOIDANOS

### 6.1. INTRODUCCIÓN

Estudios preliminares basados en la extracción de fucoidanos a partir de diversas algas demuestran que las diferencias estructurales de los fucoidanos no sólo se deben a la especie de alga, sino que se deben en gran medida al tipo de extracción llevada a cabo.

La metodología habitual para llevar a cabo la extracción de fucoidano implica el tratamiento de la muestra con soluciones a temperaturas entre los 70 y los 100 °C durante varias horas (Hahn et al. 2012) así como el tratamiento en autoclave (Wang et al. 2008).

Estudios más recientes han utilizado otro tipo de metodologías basadas en la extracción de fucoidano mediante ultrasonidos. Autores como Flórez-Fernández et al. (2017) llevaron a cabo la extracción de fucoidano de *Sargassum spp* mediante ultrasonidos obteniendo fracciones de fucoidano con actividad antitumoral.

En cuanto a los trabajos previos referentes a la extracción de fucoidano de *Bifurcaria bifurcata*, no existen publicaciones desde los años 70. Además, ninguna de las publicaciones existentes, hacen referencia a los carbohidratos presentes en las algas de las costas de España y Portugal.

El objetivo de llevar a cabo la extracción y purificación de los fucoidanos presentes en *Bifurcaria bifurcata* fue identificar posibles fracciones de fucoidano que pudieran tener alguna actividad biológica en un futuro. Hoy en día, existen múltiples publicaciones relacionadas con las actividades biológicas asociadas a fracciones de fucoidanos aisladas a partir de diversas especies de algas. Un ejemplo de ello, es el trabajo llevado a cabo por Anastyuk et al. (2012), quienes obtuvieron fracciones de fucoidanos extraídas del alga *Fucus evanescens* con actividad antitumoral sobre diferentes líneas de mieloma humano.

## 6.2. EXTRACCIÓN DE FUCOIDANO CRUDO

La extracción de fucoidano crudo se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Li et al. (2006) y Wang et al. (2008), llevando a cabo algunas modificaciones. Se pesaron 400 g de *Bifurcaria bifurcata* seca y molida y se disolvieron en 4 L de agua destilada guardando la relación 1:10 biomasa:disolvente descrita previamente por Li et al. (2006). Manteniendo dicha relación se logró que el alga absorbiera una parte del agua, pero no en su totalidad. Posteriormente, se introdujo en matraces erlenmeyer de 250 mL debidamente tapados que se llevaron al autoclave (Figura 6.1) a una temperatura de 120 °C durante 3 h, según el procedimiento descrito por Wang et al., (2008). Transcurrido dicho tiempo, los matraces se sacaron del autoclave y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en oscuridad.



Figura 6.1 Extracción de fucoidano crudo en autoclave.

A continuación, se procedió a filtrar el contenido con papel de filtro empleando un embudo Büchner. El volumen obtenido en dicho proceso fue de 480 mL. La parte sólida, correspondiente a la matriz del alga, se desechó.

El siguiente paso fue la eliminación de los alginatos. Para ello, se siguió el procedimiento descrito previamente por los investigadores (Wang et al. 2008), quienes obtuvieron 800 ml de muestra filtrada a la que le añadieron 4 g de  $MgCl_2$  y 246 ml de etanol al 85 %. Siguiendo dichas proporciones, al volumen filtrado se le añadieron 2,4 g de  $MgCl_2$  seguido de 147,6 ml de etanol al 85%. A continuación, se observó la precipitación de los alginatos en forma de agregados (Figura 6.2). La eliminación de los alginatos se llevó a cabo filtrando el volumen obtenido.



Figura 6.2. Precipitación de los alginatos durante la extracción del fucoidano.

El siguiente paso fue dializar las muestras con el objetivo de eliminar las sales. Para ello, el volumen obtenido se dializó contra agua destilada utilizando membranas de diálisis (Pur-A-Lyzer™, Millipore) de tamaño de exclusión (*cut-off*) de 3500 Dalton. La diálisis se llevó a cabo durante 48 horas realizando cambios de agua cada 12 horas y bajo condiciones de agitación constante.

Una vez finalizada la diálisis se procedió a concentrar la muestra en un rotavapor Buchi manteniendo una temperatura de 40 °C.

El siguiente paso fue llevar a cabo la precipitación de la fracción enriquecida en carbohidratos usando etanol hasta una concentración final del 80 %. Este procedimiento es similar al llevado a cabo por Wang et al. (2008), pero dichos investigadores utilizaron etanol

anhidro hasta obtener una concentración final de 75 %. Finalmente, el precipitado se filtró con membranas de poliamida de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Biotech GmbH, Alemania) usando un matraz kitasato conectado a una bomba. Finalmente, se procedió a secar la muestra de fucoidano. Para ello se colocó la membrana de poliamida con el fucoidano en una placa de petri de vidrio y se secó a 45 °C en el interior de una estufa de vacío hasta obtener un polisacárido bruto (Figura 6.3).

Gracias al secado a vacío se secó la muestra de fucoidano sin tener que someterla a una temperatura de 45 °C de forma constante, previniendo así la oxidación.



Figura 6.3. Fucoidano crudo obtenido tras el secado a 45 °C en la estufa de vacío.

### 6.3. FRACCIONAMIENTO DE LOS FUCOIDANOS

El fraccionamiento de los fucoidanos se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna (2,5 x 30 cm) de DEAE-Sepharose (CL-6B). Para controlar el flujo se utilizó un adaptador de flujo (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU). El procedimiento se describe a continuación.

El primer paso llevado a cabo fue el equilibrado de la columna. Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo descritas en el manual de instrucciones de la DEAE-Sepharose CL-6B se estableció el caudal de trabajo de 150 mL/h. Se equilibró la columna con Tris-7.8 y se midió el valor del pH a la salida de la columna. Debido a que la resina

es una resina catiónica con un pH ácido, el valor de pH a la salida de la columna fue cercano a 5. A medida que el Tris avanzó a través de la columna el pH aumentó hasta valores de 7.8, momento en el que se consideró que la columna ya estaba equilibrada. El siguiente paso fue inyectar la muestra de fucooidano. Se necesitaron 1,2 L de buffer Tris para conseguir alcanzar un pH cercano a 8.

Una vez preparada la columna se procedió a inyectar la solución de fucooidano crudo. La solución de fucooidano se preparó pesando 500 mg de fucooidano crudo que se disolvieron en 10 mL de buffer Tris-HCl pH 7.8 y se llevaron al baño de ultrasonidos durante 10 minutos facilitando así su disolución.

Con ayuda de una jeringuilla, se inyectaron lentamente los primeros 5 mL de la solución de fucooidano seguidos de los 5 mL restantes. En dicho momento, se inició el detector y se empezó a registrar el paso de la muestra. Durante 30 minutos siguientes, se dejó pasar Tris-HCl. A continuación, las fracciones de fucooidano eluyeron con una concentración creciente de soluciones de NaCl (0,5; 1,0; 1,5; y 2,0 M) a una velocidad de flujo de 150 mL/h. El volumen eluido se recogió en tubos de vidrio de 7 mL de volumen usando un colector automático (2110 Fraction Bio-Rad Collector) que colectaba el volumen eluido de la columna cada 2,5 minutos.

La Figura 6.4 muestra el aspecto de la columna de DEAE-Sephrose (CL6B) durante el fraccionamiento del fucooidano crudo.



Figura 6.4. Columna de DEAE-Sepharosa (CL6B) utilizada para llevar a cabo el fraccionamiento del fucoidano crudo.

#### 6.4. CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS

Mediante el método del ácido fenol sulfúrico (Dubois et al. 1956) se realizó una prueba cualitativa para determinar que tubos contenían carbohidratos (Figura 6.5).

La determinación de carbohidratos se realizó a partir de 500 microlitros de muestra. En una gradilla, se colocaron los tubos procedentes del colector y se tomaron muestras de 500 microlitros a las que se le añadió 250 microlitros de fenol al 5 % seguido de 1250 microlitros de ácido sulfúrico. Seguidamente, los tubos se agitaron en un vórtex (modelo MS 1, Ika Works GmbH, Staufen, Alemania), se dejaron alcanzar la temperatura ambiente y se llevaron al baño maría donde permanecieron durante 30 minutos a una temperatura de 30 °C.

Durante dicho tiempo, el contenido de los tubos fue adquiriendo una tonalidad amarilla indicativo de la presencia de carbohidratos en los tubos.

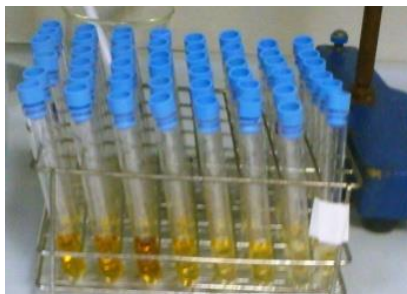


Figura 6.5. Determinación de carbohidratos por el método de Dubois. La intensidad de color de los tubos (izquierda) es indicativo de un mayor contenido en carbohidratos.

Transcurrido dicho tiempo, se dejaron enfriar los tubos y se leyó la absorbancia a 491 nm en un espectrofotómetro V-530 (Jasco Inc., Japón). Mediante la curva patrón utilizando glucosa como estándar se calculó el contenido en carbohidratos de cada tubo. Se guardaron los tubos que contenían carbohidratos y el resto se desechó.

La Figura 6.6 muestra un gráfico con los tubos que contenían carbohidratos y su respectiva absorbancia a 491 nm.

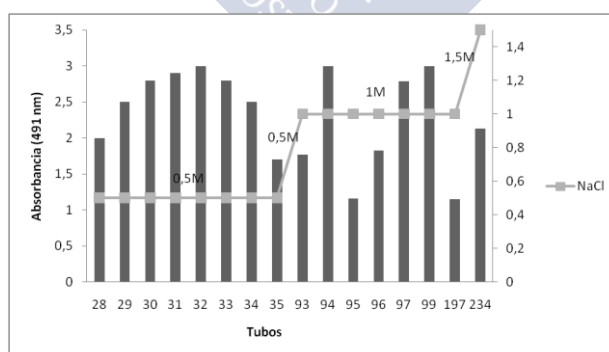


Figura 6.6 Tubos cuyo contenido en CH se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 485 nm . NaCl (0,5; 1,0 y 1,5 M): concentraciones utilizadas para llevar a cabo la elución de los carbohidratos.

Una vez seleccionados los tubos que presentaban CH se procedió a juntar los tubos que procedían de la misma fracción de la siguiente forma:

Colector 1: Los tubos 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34 son tubos que eluyeron de la columna cromatográfica con una concentración de NaCl de 0,5 M. Dichos tubos presentaban valores de absorbancia similares, en torno a 3. Por lo tanto, se trataron como tubos pertenecientes a la misma fracción y por lo tanto se juntaron en el mismo tubo denominado fracción F1.

Colector 2: El tubo 13 es un tubo que eluyó a una concentración de NaCl de 1,0 M y cuyo valor de absorbancia fue diferente al observado en los tubos anteriores, por lo tanto, se denominó fracción F2. Los siguientes tubos (14, 15 y 16) son tubos que eluyeron a la misma concentración de NaCl pero que presentaron diferentes valores de absorbancia por lo tanto se guardaron separados y se denominaron fracción F3, F4 y F5 respectivamente. Los siguientes tubos son los tubos 17 y 19, los cuales provienen de la elución de los CH a la misma concentración de NaCl y que debido a que presentaban valores de absorbancia similares se juntaron en un mismo tubo denominado fracción F7.

Colector 3: los tubos pertenecientes a dicho colector son tubos donde los CH eluyeron a concentraciones de NaCl de 1,0 y 1,5 M. El tubo 37 es un tubo que eluyó a concentración de 1,0 M y que se denotó como fracción F8. Por último, el tubo 74 es un tubo cuyos CH eluyen de la columna cromatográfica a valores de NaCl de 1,5 M y se denominó como fracción F9 por presentar valores de absorbancia diferentes al tubo anterior.

## **6.5. CONTENIDO EN CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC)**

Con el objetivo de estimar la relación de sulfato/carbono presente en cada fracción se llevó a cabo la determinación de carbono total de las 9 fracciones. Para ello, las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de nailon de 0,22  $\mu\text{m}$  (Filter-lab) y el volumen de cada tubo se ajustó a 10 mL. A continuación, dichos volúmenes se inyectaron en un analizador TOC (TOCL, Shimadzu) equipado con un detector infrarrojo no dispersivo (NDIR). La concentración de



carbono orgánico total (TOC) se determinó mediante las curvas de calibración desarrolladas a partir del estándar TOC (Código de producto: 396908.1211, Panreac, Barcelona, España) y el estándar TIC (Código de producto: 396903.1211, Panreac). El contenido en TOC se determinó por la diferencia entre el contenido de carbono total (TC) y el contenido en carbono inorgánico (IC) de cada muestra.

#### **6.6. CONTENIDO EN SULFATO**

Para la determinación del contenido en sulfato de las diferentes fracciones de polisacáridos, se llevó a cabo la metodología descrita por Dodgson (1961). Se pesaron 2,0 g de gelatina en polvo y se disolvieron en 400 mL de agua destilada a una temperatura de 60 °C. La mezcla resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvo en la nevera donde permaneció toda la noche a 4 °C. Transcurrido dicho tiempo se añadieron 2,0 g de BaCl<sub>2</sub> (Scharlau, Barcelona, España) y se agitó. El reactivo de gelatina resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas antes de hacer el ensayo.

Como estándar se utilizó sulfato de potasio (Merck). Se prepararon muestras diluidas en el rango de 50-1000 µg/mL. Posteriormente, a 100 µL de cada muestra patrón o cada fracción polisacárida se le añadieron 1,4 mL de ácido tricloroacético al 4 % seguido de 500 µL del reactivo de gelatina BaCl<sub>2</sub>. Finalmente, se agitó cada tubo en un vórtex y transcurridos 15 minutos se determinó la absorbancia a 360 nm en un espectrofotómetro (V-530, Jasco Inc., Japón).

#### **6.7. CONTENIDO EN SULFURO Y SODIO**

El contenido en sulfuro y sodio de las diferentes fracciones mediante la técnica ICP-MS (ICP-OES) se llevó a cabo con el objetivo de conocer el grado de sulfatación de las muestras a partir de la relación de azufre y carbono. A su vez se llevó a cabo el análisis del contenido de sodio de cada fracción eluída de la columna cromatográfica antes y después del proceso de diálisis y depolimerización. Para llevar a cabo el análisis por ICP-OES se prepararon diluciones de las muestras y se analizaron en un ICP-OES

(Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, EEUU). Las condiciones del ensayo fueron una potencia incidente de 1300 w, un caudal de argón auxiliar de 0.2 L/min, un caudal de argón en plasma de 15 L/min y caudal nebulizador en argón de 0.65 L/min. Las medidas se realizaron por triplicado y las longitudes de onda para la determinación del contenido en sodio y sulfuro fueron de 589.592 y 181.975 respectivamente. En cuanto al modo de vista se usó el modo radial para la determinación de sodio y el modo axial para la determinación de sulfuro.

## **6.8. ANÁLISIS ESTRUCTURAL POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

### **6.8.1. Preparación de las muestras**

Con el objetivo de llevar a cabo técnicas de espectrometría de masas que permitan determinar la masa molecular y la estructura de los polisacáridos presentes en las fracciones F1-F9, se procedió a la eliminación de las sales contenidas en las fracciones seguido de la depolimerización de las fracciones.

Las sales presentes en las fracciones provienen de la elución de dichas fracciones con concentraciones crecientes de NaCl. Estas sales pueden dañar los equipos de espectrometría de masas, por lo tanto, se eliminaron utilizando para ello tubos de diálisis (Pur-A-Lyzer Maxi, Sigma-Aldrich) con un tamaño de corte de 3500 Da. En los tubos se introdujo un volumen de 2 mL de las fracciones y posteriormente se sometieron a diálisis contra agua destilada durante 24 horas. Este procedimiento se realizó bajo condiciones de agitación y cambiando el agua destilada cada 2 horas.

Tras la diálisis, se eliminó el agua concentrando las fracciones en el rotavapor Büchi.

Posteriormente se realizó la depolimerización de las fracciones, un paso necesario para obtener polisacáridos cuyo peso molecular pueda ser detectado mediante técnicas de espectrometría de masas.

La depolimerización de las muestras se llevó a cabo mediante la autohidrólisis utilizando para ello minicolumnas de intercambio catiónico (HyperSep SCX, Thermo Scientific). Este tipo de material está formado por partículas irregulares cuyo tamaño oscila entre 40-63  $\mu\text{M}$ . El primer paso fue hidratar las columnas con agua MilliQ. A continuación, se introdujeron alícuotas de 250  $\mu\text{L}$  de las fracciones en

el interior de las minicolumnas y se colocaron sobre un manifold de vacío. Con la ayuda del manifold y la bomba de vacío, el volumen de las muestras descendió por capilaridad impregnando la resina de las columnas.

Por último, se llevó el manifold a la estufa donde permaneció durante 48 horas a 37 °C para facilitar la hidrólisis de los fucoidanos. La depolimerización de los fucoidanos ocurre gracias a los protones que cede la resina de las columnas.

Transcurridas 48 horas, se adicionó 100 µL de agua destilada a cada minicolumna y se recuperó toda la muestra posible de su interior con ayuda del manifold conectado a la bomba de vacío.

Finalmente, el volumen recuperado se transfirió a tubos Eppendorf y se llevó a cabo la neutralización con amoníaco al 5% hasta alcanzar valores de pH cercanos a 7.

A continuación, siguiendo el procedimiento llevado a cabo por Anastyyuk et al. 2017, se separaron los polisacáridos de alto peso molecular de los de bajo peso molecular mediante la adición del 20 % de etanol al 96 % (Anastyyuk et al. 2017). En ninguna de las fracciones se observó la precipitación de polisacáridos de alto peso molecular.

Finalmente, se tomaron las 9 fracciones y se llevaron al servicio de análisis de muestras (CACTUS) donde se realizaron técnicas analíticas de espectrometría de masas.

## **6.9. ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

### **6.9.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF**

Para elucidar los componentes de las fracciones de fucoidano, se aplicó la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción ionización láser asistida por matriz con un detector de masas de tiempo de vuelo). El equipo utilizado para ello fue un espectrómetro AutoFlex (Bruker, Alemania) con láser Smartbeam (355nm). Las condiciones de operación establecidas para el modo de ión negativo fueron una tensión de aceleración de 18,83 kV y unos 900-1900 disparos por muestra. Los espectros de masas se adquirieron en un rango  $m/z$  de 0 a 20.000 Da.

Para el análisis MALDI-TOF, la muestra se introdujo previamente en cartuchos Ziptip®. Posteriormente, las muestras se disolvieron en

50:50 de acetonitrilo-agua/TFA (0,1 %) y después se mezclaron con una solución de matriz de DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) (Acetonitrilo: agua (30:70) / TFA 0,1 %). Posteriormente, la mezcla se introdujo en la placa de muestra y se secó.

### **6.9.2. Espectrometría de masas ESI**

Por otro lado, las fracciones se sometieron al análisis mediante espectrometría de masas por ionización electrospray (ESI-MS). El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas ESI FIA-TOF (Modelo 6410B-QQQ) con una fuente de ionización por electrospray. El análisis se realizó en modo ión negativo y las condiciones del ensayo establecidas fueron un voltaje capilar de 4500V y una temperatura de gas de secado de 200 °C. Las muestras de fucoidano se disolvieron previamente en acetonitrilo-agua (50:50) y se introdujeron en el espectrómetro de masas en metanol-agua (50:50) / Ácido fórmico con un caudal de 0,1 ml/min mediante la técnica FIA.

## **6.10. RESULTADOS**

### **6.10.1. Rendimiento de la extracción**

Se procedió al cálculo del rendimiento de la extracción de fucoidano teniendo en cuenta la masa de alga seca de partida (400 g) y la masa de fucoidano obtenido (3 g). El rendimiento obtenido fue del 0,75%.

### **6.10.2. Perfil cromatográfico de los fucoidanos sulfatados**

La cromatografía de intercambio iónico junto con el seguimiento del contenido en carbohidratos permitió separar 9 fracciones enriquecidas en carbohidratos que muestran valores de absorbancia superiores a 1,5. Las fracciones F1 y F2 incluyen los carbohidratos que eluyen antes de la columna con una concentración de NaCl 0,5 M, se trata de los carbohidratos más neutros y por lo tanto en un principio los menos sulfatados. En cuanto a las fracciones F3-F8, se eluyeron una concentración de NaCl 1M y la fracción F9 se eluyó con una concentración de NaCl 1,5M.

La Tabla 6-1 muestra el volumen empleado para la elución de cada una de las fracciones, así como el número de volúmenes de columna empleados.

En el caso de la fracción F1 y F2 la elución se llevó a cabo entre los volúmenes de elución de 175 y 219 ml, representando 1,2-1,5 volúmenes de columna.

En el caso de las fracciones F3-F8, el volumen de elución se llevó a cabo entre los 581 y 1084 ml (4-7,4 volúmenes de columna).

Finalmente, la última fracción F9, se obtuvo a partir de la elución con NaCl 1,5 M a 1458 ml (10 volúmenes de columna).

No se obtuvieron fracciones de polisacáridos a partir de la elución con una concentración de NaCl 2,0 M.

### **6.10.3. Contenido en carbohidratos (CH)**

La mayoría de los carbohidratos eluyeron de la columna cromatográfica con una concentración de NaCl de 1,0 M.

El cálculo del contenido en CH sulfatados mostró que las fracciones F1, F4, F7 y F9 presentaban el mayor contenido en carbohidratos sulfatados, expresado como equivalentes de glucosa. En cambio, las fracciones F5 y F8 fueron las fracciones que tuvieron menor contenido en carbohidratos sulfatados. Por otro lado, las fracciones F3 y F6 mostraron valores similares en el contenido de carbohidratos sulfatados (Tabla 6-1). En función de esto, las fracciones F4, F7 y F9 representan aproximadamente el 50 % del contenido en carbohidratos.

### **6.10.4. Contenido en carbono orgánico total (TOC)**

El valor del carbono orgánico total (TOC) de cada fracción es representativo del contenido de carbohidratos presente en cada fracción.

El cálculo del carbono orgánico total se realizó por diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico. Como se puede ver en la Tabla 6-2, los valores de carbono inorgánico fueron insignificantes en comparación con el carbono total.

**Tabla 6-1** Tabla que muestra el contenido en carbohidratos, los volúmenes de elución, así como el volumen y la cantidad recuperada de cada fracción.

Fracciones	Contenido en carbohidratos (mg/L)	Volumén elución (mL)	Volumen recuperado (mL)	Cantidad recuperada (mg)
F1	218,4	175-212	49	10,7
F2	126,3	212-219	7	0,9
F3	131,0	581	7	0,9
F4	223,0	587	7	1,6
F5	86,2	594	7	0,6
F6	136,0	601	7	0,9
F7	222,0	608-622	14	3,0
F8	85,4	1084	7	0,6
F9	158,2	1458	14	2,2

### 6.10.5. Grado de sulfatación

Se llevo a cabo una selección de las fracciones de fucoidano en función del tiempo de elución y el rendimiento recuperado. El grado de sulfatación de las fracciones de fucoidano seleccionadas se determinó a partir de la relación S/TOC y la relación de contenido de S/azúcares en estas fracciones.

La relación S/TOC de las fracciones F1 y F2 demostró que ambas fracciones presentaban el mayor contenido en carbohidratos sulfatados. Así mismo, el contenido en fucosa resultó mayor en ambas fracciones demostrando a su vez una mayor relación de S/fucosa. Por lo tanto, la fracción F1 es la fracción que presenta mayor contenido en carbohidratos, principalmente alginatos y cuyo contenido en fucoidanos es mínimo.

El contenido en sulfatos de las fracciones de polisacáridos mediante el método de Dodgson mostró que las fracciones F1, F2 y F3

contenían mínimas cantidades de sulfato no detectable. En cuanto a la fracción F4, su contenido en sulfato fue bajo en comparación con las fracciones que eluyeron más tarde de la columna cromatográfica. Esas fracciones correspondían a las fracciones F5, F6 y F7, cuyo mayor contenido en sulfato se muestra en la Tabla 6-3.

**Tabla 6-2 Contenido en Carbono Total (CT), Carbono Inorgánico (CI) y el Carbono Orgánico Total (TOC) de las fracciones de fucooidano. Los valores representan la media con la desviación estándar (SD) de las medidas en triplicado.**

Fracciones	Carbono Total (TC)	Carbono Inorgánico (IC)	Carbono Orgánico Total (TOC)
F1	4564,0 $\pm$ 50,2	90,9 $\pm$ 0,9	4474,0 $\pm$ 50,2
F2	2547,4 $\pm$ 34,4	92,06 $\pm$ 3,1	2454,8 $\pm$ 34,5
F3	340,0 $\pm$ 6,8	11,4 $\pm$ 0,6	328,6 $\pm$ 6,8
F4	658,6 $\pm$ 4,7	7,2 $\pm$ 0,3	651,4 $\pm$ 4,7
F5	1059,0 $\pm$ 3,5	12,4 $\pm$ 0,3	1046,6 $\pm$ 3,5
F6	2993,0 $\pm$ 15,6	19,9 $\pm$ 0,7	2973,1 $\pm$ 15,6
F7	2705,0 $\pm$ 21,2	17,6 $\pm$ 0,5	2687,4 $\pm$ 21,22
F9	321,5 $\pm$ 7,5	12,6 $\pm$ 0,5	308,9 $\pm$ 7,5

**Tabla 6-3 Contenido en sulfatos, S, relación TOC/S y relación Fucosa/sulfato de las diferentes fracciones de fucoidano.**

Fracciones Fucoidano	Contenido en sulfatos (mg/L)	Contenido en S (mg/L)	S (mM)	TOC/S ratio (mol/mol)	Fucosa/sulfato (mol/mol)
F1	nd	44,9 ± 1,1	1,4	265,7	19,4
F2	nd	42,1 ± 1,3	1,3	155,7	11,4
F3	nd	15,0 ± 0,5	0,5	58,3	4,3
F4	62,7 ± 14,0	46,1 ± 0,6	1,4	38,0	2,7
F5	1589,4 ± 210,7	1598 ± 0,9	5,0	17,5	1,3
F6	715,4 ± 215,9	199,2 ± 3,3	6,2	40,0	2,0
F7	942,73 ± 158,2	209,1 ± 1,6	6,5	34,3	2,5
F9	nd	46,9 ± 1,8	1,5	17,5	1,3

Como se muestra en la Tabla 6-4, la relación S/TOC y la proporción de contenido de S/azúcar de F1 y F2 después del proceso de diálisis y despolimerización también es la más alta.



**Tabla 6-4 Contenido en sulfatos, S, relación TOC/S y Fucosa/sulfato de las fracciones F1, F2, F3, F4 Y F9 tras la diálisis y depolimerización**

Fracciones Fucoïdano	Contenido en sulfatos (mg/L)	Contenido en S (mg/L)	S (mM)	TOC/S ratio (mol/mol)	Fucosa/sulfato (mol/mol)
F1	nd	88,9 ± 1,4	2,8	218,1	15,9
F2	nd	73,5 ± 7,2	2,3	87,3	6,4
F3	nd	44,3 ± 1,6	1,4	29,7	2,2
F4	62,7 ± 14,0	166,9 ± 0,7	5,2	25,8	1,9
F9	nd	94,9 ± 4,6	2,9	26,7	1,9

#### **6.10.6. Análisis elemental**

Con el objetivo de determinar el contenido en Na y S antes y después de los procesos de diálisis y autohidrólisis, se llevó a cabo el análisis elemental de algunas de las fracciones de polisacáridos.

Gracias a este ensayo se observó que la concentración de sodio en las fracciones seleccionadas después de la diálisis y la autohidrólisis había disminuido (Tabla 6-5).

Por otro lado, se observó que la concentración de S en las fracciones no seguía un comportamiento lineal como se puede observar en la Tabla 6-5.

Tabla 6-5 Contenido en Sulfuro y Sodio de las fracciones seleccionadas. Na(mg/L) y S(mg/L): Concentración de sodio y sulfuro antes de dializar y depolimerizar. \*Na(mg/L) y \*S(mg/L): Concentración de sodio y sulfuro después de dializar y depolimerizar.

Fracciones	Na (mg/L)	*Na (mg/L)	S(mg/L)	*S(mg/)
F1	8222,5 ± 78,6	1567,3 ± 52,2	44,90 ± 1,6	88,95 ± 1,0
F2	9076,3 ± 87,6	736,5 ± 4,7	42,05 ± 1,3	73,54 ± 7,2
F3	11545.3 ± 193	43,7 ± 0,3	15 ± 0,5	44,27 ± 1,6
F4	11796 ± 301	199 ± 3,8	46,07 ± 0,6	166,99 ± 0,7
F9	23380 ± 319	248 ± 1,6	46,98 ± 2,0	94,94 ± 4,6

#### 6.10.7. Análisis por espectrometría de masas

Gracias al proceso de autohidrólisis se consiguieron obtener fragmentos de polisacáridos detectables por espectrometría de masas MALDI-TOF. Estos fragmentos tenían un tamaño molecular entre los 1000 y los 5000 KDa. La Figura 6.7 muestra el tamaño molecular de las fracciones de fucoidano correspondiente a la fracción F1.

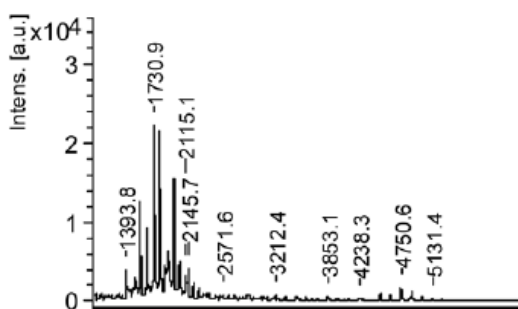


Figura 6.7 MALDI-TOF modo ión negativo de un oligosacárido sulfatado obtenido por autohidrólisis de fracciones de fucoidano (F1).

Gracias a los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas ESI se consiguieron detectar una serie de fragmentos cuyas masas se resumen en la Tabla 6-6. Algunos de estos fragmentos han sido comparados con otros fragmentos de fucooidanos publicados anteriormente y en algunos casos se han encontrado algunas similitudes.

**Tabla 6-6 Fragmentos de masas obtenidos mediante ESI-MS.**

Fracciones	Fragmentos de masa (m/z)	Fragmentos en literatura (m/z)
1, 2, 3	194, 266, 308,402, 497.	307,403
4	194,248,288,308,402,497	-
5	246,279,288,308,402,497	279
6	194,266,288,308,402,497	-
7	194,205,225,243,308,389	225,243,389,451
8	497	491
9	308,402,451,487,	-

Tras llevar a cabo un análisis de los fragmentos de masas encontrados en todas las fracciones de fucooidano se encontró que la señal a m/z 497 correspondía a  $[\text{Fuc}_2\text{SO}_3] + \text{Na}$ .

Además, en todas las fracciones apareció un conjunto de fragmentos principales. Estos fragmentos corresponden a los observados a m/z 225, 243 y m / z 279.

Tras una búsqueda bibliográfica se concluyó que estos fragmentos corresponden a  $\text{Fuc1SO}_3\text{Na-H}_2\text{O-Na}$ ,  $\text{Fuc 1SO}_3\text{Na-Na}$  y  $\text{Fuc4}(\text{SO}_3\text{Na})^{3-} 3\text{Na}$  3 respectivamente.

Estos fragmentos fueron publicados anteriormente por otros investigadores en *Fucus evanescens* (Anastyuk et al. 2010).

De la misma manera, el ion a m / z 112 fue un ión muy abundante en todas las fracciones. Se llevo a cabo una revisión bibliográfica y se encontró que este ión había sido publicado anteriormente por Thuy et al. 2015 pero con una intensidad menor. Por lo tanto, dicho fragmento puede ser un fragmento de un sulfato.





## **7. ENSAYOS DE** **BIOACTIVIDAD**



## 7. ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

### 7.1. ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

La citotoxicidad se define como la capacidad que tiene un compuesto de producir la muerte celular. La citotoxicidad se mide mediante test de citotoxicidad *in vitro*, los cuales se centran en una serie de respuestas a nivel celular que pueden ser utilizadas como biomarcadores de citotoxicidad. Entre dichas respuestas se incluyen cambios en la morfología de la célula, cambios en la permeabilidad de la membrana, reducción de la función mitocondrial, entre otras. Este tipo de respuestas se han estandarizado a lo largo de los años en una gran variedad de células. Además, los test de citotoxicidad *in vitro* dan información sobre el rango de concentración del compuesto que provoca dicha toxicidad. Esta información es de gran valor para llevar a cabo posteriores ensayos *in vitro* que proporcionarán más información acerca de la muerte celular programada. Estableciendo la dosis a partir de la cual se ven afectadas el 50 % de las células es posible comparar respuestas cuantitativas tanto de componentes individuales en diferentes sistemas como de varios compuestos en sistemas individuales (Eisenbrand et al. 2002). Por lo tanto, un parámetro importante a la hora de hablar de citotoxicidad es el índice EC50 que se define como la mínima concentración capaz de producir la mortalidad del 50% de las células.

Testar la citotoxicidad de un compuesto es el primer paso en la búsqueda de compuestos bioactivos con interés farmacológico. Para ello, primero es necesario llevar a cabo ensayos *in vivo* o *in vitro*. Los ensayos *in vitro* con múltiples ventajas sobre los ensayos *in vivo*, se realizan en diferentes modelos de líneas celulares, cuyos resultados dictaminan la citotoxicidad o no de un determinado compuesto. Existen múltiples líneas celulares utilizadas para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad, desde líneas celulares de origen humano a

líneas celulares de origen murino, que permiten testar diferentes tipos de compuestos con diversos orígenes.

Gracias a los avances en los cultivos celulares, hoy en día se pueden testar múltiples compuestos de origen natural sobre multitud de líneas celulares. Una de las grandes ventajas del uso de cultivos celulares es la posibilidad de controlar las condiciones del medio, así como la reproducibilidad de los resultados. Además, los cultivos celulares presentan otras ventajas sobre otros sistemas experimentales: limitan el uso de animales de experimentación y anticipan resultados que pueden ayudar a la realización de ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, también presentan ciertas limitaciones, entre ellas, la dificultad a la hora de extrapolar los mecanismos que ocurren en un organismo *in vivo*. No obstante, actualmente, los cultivos celulares son la herramienta más valiosa de la que dispone la biomedicina (O'Brien et al. 2000).

Los cultivos celulares se pueden llevar a cabo sobre diferentes tipos de materiales, como, por ejemplo, las placas de Petri o frascos de cultivo o microplacas. El material a emplear dependerá del tipo de célula con la cual se trabaje. Las células adherentes, necesitarán de una superficie para adherirse; por el contrario, las células no adherentes crecerán en suspensión. Posteriormente, las células que proliferaran gracias a la adición del medio de cultivo y al control de las condiciones del medio.

## **7.2. MÉTODOS DE VALIDACIÓN DE COMPUESTOS NATURALES**

Existen varias metodologías para llevar a cabo el *screening* previo de compuestos naturales. Entre ellos, se encuentran los test de toxicidad que miden la actividad metabólica de una célula. De todos los ensayos que miden la función metabólica, el MTT es uno de los métodos más utilizados. El ensayo del MTT fue descrito por Mosmann (1983) y posteriormente ha sido adaptado por diversos autores.

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad que tienen las células vivas de transformar el bromuro de tetrazolio en cristales de formazán.



El ensayo MTT es un método extensamente utilizado por su bajo coste económico, para testar el efecto citotóxico de fármacos en líneas celulares normales y/o tumorales. También es un método ampliamente utilizado para testar la citotoxicidad de determinados compuestos derivados de organismos como las esponjas marinas (Beedessee et al. 2012) y de plantas como las algas (Kang et al. 2011) con diversos fines, entre los que destaca la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral (Dias et al. 2005; Alves et al. 2016).

### 7.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Con el objetivo de testar la citotoxicidad de las fracciones de polifenoles obtenidas mediante la metodología detallada en el capítulo 3, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* en diferentes líneas celulares. En primer lugar, las fracciones de polifenoles se testaron en una línea celular murina ATDC5 y a continuación se testaron en una línea celular humana ARH77. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos en la línea celular de macrófagos de ratón, RAW 264.7.

### 7.4. LÍNEA CELULAR MURINA

La línea celular murina seleccionada para llevar a cabo los estudios de citotoxicidad fue la línea celular condrogénica murina ATDC5. Esta línea es una línea derivada de un teratocarcinoma de ratón, caracterizada por ser una línea continua. Se trata de una línea celular ampliamente utilizada en los ensayos *in vitro* por su facilidad a la hora de reproducir los procesos de formación que tienen lugar durante el desarrollo del cartílago.

Las células ATDC5 pueden proliferar rápidamente dando lugar a una gran cantidad de células, estableciendo así un sistema de cultivo *in vitro* que puede imitar la condensación celular durante la condrogénesis *in vivo*. Además, estas células pueden mantener el estado indiferenciado durante su proliferación constituyendo un excelente modelo para investigar los mecanismos moleculares que tienen lugar durante condrogénesis *in vitro* (Yao y Wang 2013).

La línea celular ATDC5 una línea que responde bien a los ensayos *in vitro* por lo que se ha utilizado para llevar a cabo estudios de citotoxicidad de compuestos naturales. Autores como Iacono et al.

(2010), testaron la actividad citotóxica del oleocantal, un compuesto fenólico del aceite de oliva, en las células ATDC5. Otros autores como Yang et al. (2016) también testaron la citotoxicidad del aloemodina, una antraquinona presente en el aloe Vera, sobre las células ATDC5.

#### **7.4.1. Preparación del medio**

El medio necesario para el mantenimiento de las células ATDC5 se compone de medio DMEM/Ham's F12 suplementado con suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*, FBS), antibiótico (penicilina), L-glutamina, selenito sódico y apotransferrina.

Para la preparación del medio, se tomó una botella de 500 mL de medio DMEN/Ham's F12 y se le adicionó 25 mL FBS (5%), 10 mL de antibiótico (50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina), 10 mL de L-Glutamina, 500 µL de selenito sódico ( $3 \cdot 10^{-8}$ M) y 1 mL de apotransferrina (10 µg/ml). Posteriormente, se filtró utilizando para ello una unidad de filtración de 0.20 µm y se mantuvo en nevera hasta el momento de su utilización.

#### **7.4.2. Mantenimiento de los cultivos celulares**

Las células ATDC5 son células adherentes que crecen en monocapa adheridas a la base de las placas de Petri. Para el mantenimiento de las células, estas se cultivaron en placas de Petri de 10 cm de diámetro que se mantuvieron en el incubador de CO<sub>2</sub> (NuAire, MN, EE.UU.) bajo unas condiciones controladas de temperatura (37 °C), humedad y atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%). El mantenimiento de los cultivos se llevó a cabo realizando subcultivos celulares cada dos 2-3 días, hasta alcanzar la confluencia del 80 %. En dicho momento, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio de cultivo nuevo. El procedimiento llevado a cabo para el subcultivo celular se detalla a continuación.

En primer lugar, se calentó tanto el medio DMEM F12 como la tripsina en el baño termostatzado a 25 °C. A continuación, las placas con las células ATDC5 que se mantenían en cultivo se llevaron a la campana de flujo laminar. Una vez allí, se procedió a realizar el pase celular. Para efectuar el pase celular, se retiró el medio de la placa de

una pipeta serológica en condiciones de esterilidad y a continuación se procedió a despegar las células adicionando 1,5 mL de tripsina (500 mg/ml) y ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) (200 mg/L) (Lonza, España). Seguidamente, se tapó la placa de Petri, se movió en círculos ayudando a las células a despegarse y se retiró la tripsina. A continuación, se añadió de nuevo el mismo volumen de tripsina y se llevó al incubador durante 5 minutos, tiempo en el cual las células se despegaron. Posteriormente, las células se resuspendieron con 7 ml de medio DMEM con suero, el cuál inactivó la acción de la tripsina. Seguidamente, se procedió a contar el número de células presente en la suspensión celular con ayuda del colorante azul tripán y de la cámara de Neubauer.

A continuación, las células se vuelven a sembrar en placas de Petri a la concentración de  $5 \times 10^5$  células/placa. Estas placas se llevaron nuevamente al incubador y se mantuvieron hasta el momento de realizar de nuevo el siguiente subcultivo celular.

#### **7.4.3. Tratamientos.**

Las fracciones polifenólicas seleccionadas para llevar a cabo el tratamiento de las células ATDC5 fueron las fracciones obtenidas mediante extracción en acetona-agua (F9, F14, F32 y F37) y las fracciones obtenidas mediante extracción acuosa asistida por ultrasonidos (F2 y F3). El paso preliminar antes de tratar las células fue la preparación de las fracciones. Para ello, se prepararon las concentraciones necesarias para cada uno de los tratamientos según el plan diseñado.

A partir de las concentraciones de cada fracción (Tabla 7-1), se llevaron a cabo las diluciones necesarias para cada tratamiento.

En muchos de los casos, se hicieron diluciones seriadas para minimizar el posible error en el pipeteo.

Tabla 7-1 Fracciones testadas y concentraciones de partida ( $\mu\text{M}$ )

Fracciones testadas	Concentración de partida ( $\mu\text{M}$ )
F9	1309,3
F14	488,2
F32	1635,67
F37	2931,2
F2	2262,02
F3	79.52

El medio utilizado para obtener las diluciones necesarias fue medio sin suero. Dicho medio contiene los mismos aditivos que el medio utilizado para el mantenimiento de las células ATDC5 salvo que no contiene FBS. El motivo por el cual se prepararon las diluciones con este medio es impedir que el FBS interfiera en los tratamientos. El proceso se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar (Figura 7.1) en condiciones mínimas de luz para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos.



Figura 7.1. Interior de una cabina de flujo laminar.

Los tratamientos para cada una de las fracciones se detallan en la Tabla 7-2.

**Tabla 7-2. Fracciones y concentraciones testadas ( $\mu\text{M}$ ) o tratamientos utilizados en el ensayo MTT.**

Fracciones	Concentraciones testadas ( $\mu\text{M}$ )			
F9	100	1,0	0,01	0,0001
F14	100	1,0	0,01	0,0001
F32	100	1,0	0,01	0,0001
F37	100	1,0	0,01	0,0001
F2	1	0,5	0,25	0,1
F3	1	0,5	-	-

Una vez preparadas todos tratamientos se procedió a filtrarlos mediante filtros estériles de  $0,25 \mu\text{m}$ .

#### **7.4.4. Ensayo MTT**

Las células ATDC5 se adquirieron en el RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón) y se mantuvieron en cultivo en estado indiferenciado hasta el momento de su utilización. Para llevar a cabo el ensayo MTT, las células ATDC5 se sembraron en placas de 96 pocillos (P96) a una densidad de 8000 células/pocillo. Para ello se tomaron las células ATDC5 que se mantenían en cultivo y se llevaron a la campana de flujo laminar. Una vez allí, se extrajo el medio, se despegaron con tripsina y se resuspendieron en 7 mL de medio. A continuación, se depositó todo el volumen de células en el interior de un tubo Falcón estéril y se procedió a contar las células en la cámara de Neubauer.

Una vez contadas las células, se realizaron los cálculos para sembrar las células en función del número de placas P96. Tras la siembra, se llevaron al incubador donde permanecieron durante 5 horas hasta su completa adhesión.

Una vez adheridas se sacaron del incubador y se observaron al microscopio comprobando su adhesión. A continuación, se procedió a serodeprivar las células con el objetivo de que todas las células estuvieran en las mismas condiciones de ciclo celular, evitando así diferencias en los resultados. La eliminación del suero logra igualar la actividad metabólica de las células evitando diferencias en la proliferación. Para ello, se conectó una pipeta serológica de 5 mL a la unidad de vacío de la cámara de flujo laminar y se procedió a la aspiración del medio de cada uno de los pocillos de las placas P96, excepto en los pocillos referentes al control de FBS. Seguidamente, se adicionó a cada pocillo el medio sin FBS y se volvieron a incubar hasta el día siguiente (12 horas) hasta el momento de llevar a cabo los tratamientos.

Al día siguiente, se trataron las células con los diferentes tratamientos previamente preparados en medio libre de FBS.

Finalizado el tratamiento, se procedió a incubar las células durante 24 y 48 horas protegidas de la luz. Cuatro horas antes de que finalizaran los tratamientos, se cogieron las placas P96 y a cada pocillo se le añadió un volumen de 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) obteniendo una concentración final de 0,5 mg/mL. Finalizados los tratamientos, se procedió a disolver los cristales de formazán. Para ello, a cada pocillo se le añadió un volumen de 100  $\mu$ L del agente solubilizante SDS (Sodio docecil sulfato) al 10 % en HCl (0.01M). Posteriormente, se dejaron de nuevo en el incubador y 12 h después se procedió a la lectura de la absorbancia en un lector de placas ELISA (Multiskan Plus, Thermo Labsystem, Finlandia) a la longitud de onda de 550 nm utilizando el software Génesis. Los resultados obtenidos se interpretaron como porcentaje de MTT metabolizado por las células, indicativo del metabolismo celular de las células viables. Dichos valores se representaron en porcentaje respecto a los valores obtenidos en el control (valor arbitrario 100).

#### 7.4.5. Análisis estadístico

Los ensayos de actividad biológica se llevaron a cabo por triplicado y los resultados fueron analizados mediante Microsoft Excel 2010 y el programa Graph Pad Prism 7.2 (GraphPad Software, EE.UU). Los resultados obtenidos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparación múltiple Dunnet para comparar los resultados obtenidos. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

#### 7.4.6. Resultados

7.4.6.1. Efecto de las fracciones F9, F14 y F32 y F37 sobre la vitalidad de las ATDC5.

Con el objetivo de estudiar la citotoxicidad de las fracciones polifenólicas sobre las células ATDC5 se realizó el ensayo MTT con las fracciones polifenólicas F9, F14, F32 y F37.

Como se puede observar en la Figura 7.2, tras 24 horas de tratamiento de las células con la fracción F9 sólo la dosis de 100  $\mu$ M redujo la vitalidad de las células un 20 %, siendo este valor no estadísticamente significativo y demostrando así que dicha fracción no es tóxica para las células ATDC5. Por el contrario, 24h después del tratamiento de las células con la fracción F14 a la dosis de 100  $\mu$ M se observó una reducción significativa de la vitalidad de las células ATDC5 alcanzando una reducción del 50 % y demostrando una clara inhibición de la proliferación de las células. Ambas fracciones tuvieron que ser testadas en el ensayo MTT a dosis significativamente más bajas, ya que no se disponía de cantidades suficientes para repetir los ensayos a dosis altas. Los resultados obtenidos en el rango de dosis entre  $10^{-4}$   $\mu$ M y 1  $\mu$ M no demostraron ningún efecto tóxico de estas fracciones. Es nuestra intención demostrar un efecto farmacológico dosis dependiente de la fracción F14 mediante el análisis de dosis intermedias entre 1 y 100  $\mu$ M.

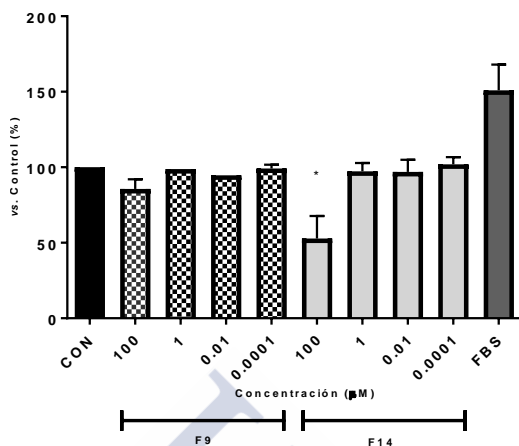


Figura 7.2. Vitalidad de las células ATDC5 después del tratamiento con F9 y F14 a diferentes concentraciones (μM). \*Diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.05$ ). CON: control, FBS: control de FBS.

Por otro lado, el tratamiento de las células con la fracción F9 tras 48 horas de exposición siguió sin mostrar efectos citotóxicos con las dosis testadas. Por el contrario, como cabía esperar, la fracción F14 sí mostró una reducción de la vitalidad de las células ATDC5. La fracción F14 redujo la vitalidad de las células un 40 % mostrando un 60 % de inhibición, mientras que las otras concentraciones evaluadas no mostraron apenas actividad biológica.

La Figura 7.3 muestra los resultados obtenidos tras 48 horas de tratamiento de las células con las fracciones F9 y F14.



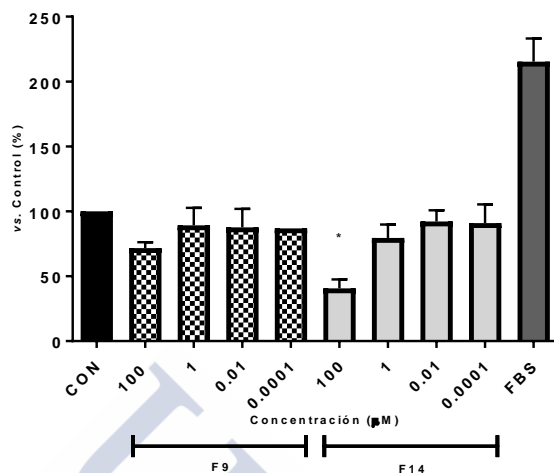


Figura 7.3. Vitalidad de las células ATDC5 tras 48 horas de tratamiento con las fracciones F9 y F14 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). \*Diferencias significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ). CON: control, FBS: control de FBS.

En cuanto a los resultados obtenidos tras 24 horas de tratamiento con las fracciones F32 y F37 a las dosis de 100, 1, 0,01 y 0,0001  $\mu\text{M}$  no se observó inhibición de la viabilidad celular de las células ATDC5 (Figura 7.4). Los resultados representan el porcentaje respecto al control de la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes

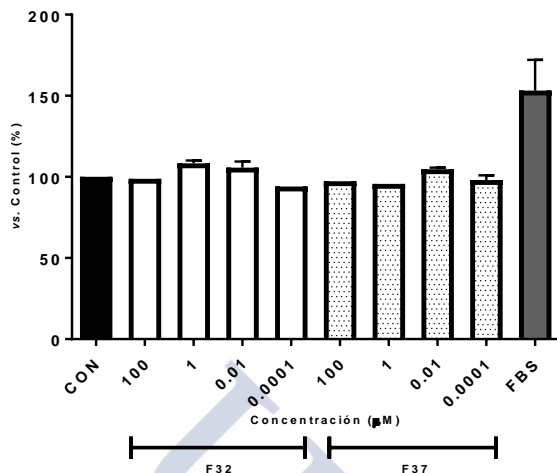


Figura 7.4. Vitalidad de las células ATDC5 tras 24 horas de tratamiento con las fracciones F32 y F37 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). CON: control, FBS: control de FBS.

Por el contrario, transcurridas 48 horas después del tratamiento con la fracción F32 se observó la mortalidad de las células ATDC5 en un 40 % cuando se trataban las células con la concentración más alta, es decir a la dosis 100  $\mu\text{M}$  (Figura 7.5). Los resultados representan el porcentaje respecto al control de la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes

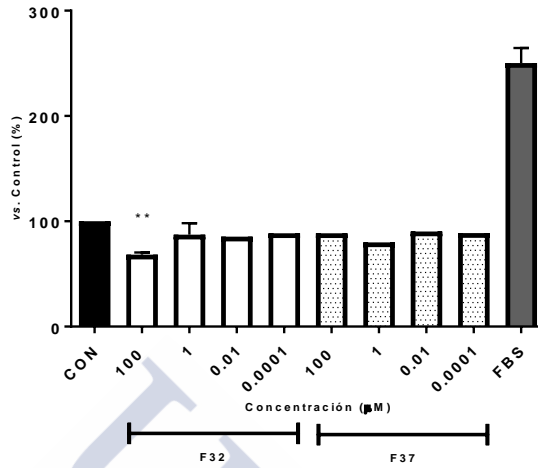


Figura 7.5. Vitalidad de las células ATDC5 tras 48 horas de tratamiento con las fracciones F32 y F37 a diferentes concentraciones (μM. \*\*  $p < 0,01$  CON: control, FBS: control de FBS.

7.4.6.2. Efecto del tratamiento con las fracciones F2 y F3 sobre la viabilidad celular de las células ATDC5.

Figura 7.6, 24 horas después de tratar las células ATDC5 con la fracción F2 a las concentraciones de 1, 0,5, 0,25 y 0,1  $\mu\text{M}$  se observó que el tratamiento con la dosis 1  $\mu\text{M}$  inhibió un 50 % la vitalidad de las células ATDC5 mostrando por lo tanto un 50 % de mortalidad de las células. Por el contrario, en el caso de la fracción F3 no se observó inhibición de la viabilidad celular a ninguna de las dosis testadas. Los resultados representan el porcentaje respecto al control de la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes.

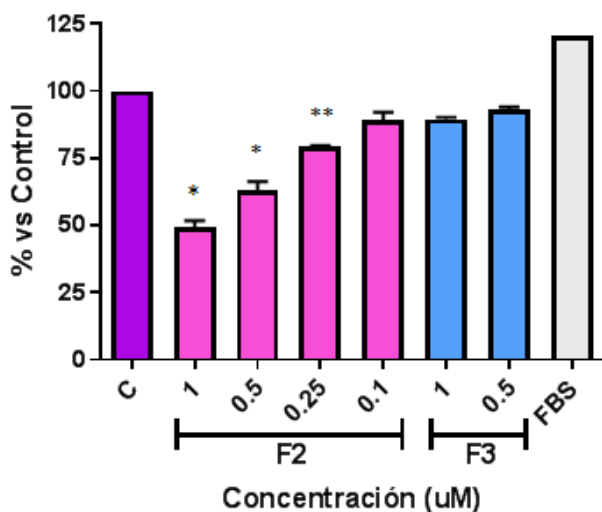


Figura 7.6. Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ATDC5 tras 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (1, 0,5, 0,25, 0,1) y F3 (1, 0,5).. \* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$  C: Control, FBS: Control de FBS.

Por otro lado, 48 horas después de tratar las células con la fracción F2 se observó un incremento de la mortalidad celular

alcanzando valores de un 75 % de mortalidad de las células ATDC5 a las dosis 1  $\mu$ M, mientras que el resto de dosis testadas mostraron valores similares a los detectados tras 24 horas de tratamiento.

En el caso de la fracción F3, tras 48 horas de tratamiento se observa una disminución de la viabilidad celular provocando aproximadamente un 20 % de mortalidad celular (Figura 7.7). Los resultados representan el porcentaje respecto al control de la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes.

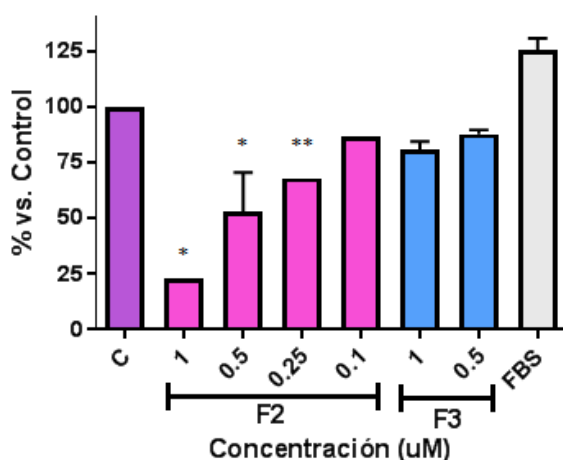


Figura 7.7. Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ATDC5 tras 48 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu$ M) de F2 (1, 0,5, 0,25, 0,1) y F3 (1, 0,5). \* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,05$  C: Control, FBS: Control de FBS.

A la vista de estos resultados, se seleccionaron las fracciones F2 y F3 para llevar a cabo estudios de toxicidad sobre líneas tumorales humanas con el objetivo de hallar una fracción con potencial actividad antitumoral.

## **7.5. LÍNEA CELULAR HUMANA DE MIELOMA MÚLTIPLE**

La línea elegida para llevar a cabo el ensayo MTT fue la línea de linfoma humano ARH77, debido que es una línea tumoral muy agresiva de mieloma múltiple.

### **7.5.1. Introducción**

La línea celular de mieloma humano ARH77 es una línea cuyas células crecen en suspensión. Por lo tanto, su manejo y sus requerimientos son diferentes a los de las células adherentes.

### **7.5.2. Preparación del medio**

El medio utilizado para mantener las células ARH77 fue el medio RPMI. Dicho medio se preparó a partir del medio comercial RPMI. Para la preparación de 250 mL medio RPMI se adicionaron L-glutamina (10 mL) y antibiótico (10 mL) a una botella comercial de 500 ml de medio RPMI. Posteriormente, se filtraron aproximadamente 250 mL de dicho medio y se le añadió 2,5 mL de HEPES 1M, 2,5 mL de sodio piruvato, 1,250 mL de Glucosa al 50% y 25 mL de FBS (10%). Los 250 mL restantes constituyeron el medio RPMI sin FBS, necesario para llevar a cabo la dilución de los tratamientos.

### **7.5.3. Mantenimiento de los cultivos celulares**

Las células ARH77 se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 mL en el interior del incubador de CO<sub>2</sub> bajo unas condiciones controladas de temperatura (37 °C), humedad y atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%). Cuando se alcanzaba una confluencia del 80% se procedía a llevar a cabo subcultivos celulares, esto ocurría cada 2-3 días. En dicho momento, se despegaban las células acomodadas en el frasco de cultivo, se introducían en el interior de un falcón y se llevaban a centrifugar durante 10 minutos a 400 G. Tras la centrifugación se decantó el medio y las células se resuspendieron en 8 mL de medio RPMI. Posteriormente, se cultivaron en frascos de cultivo de 75 mL a los que previamente se les adicionó 13 ml de medio y se llevaron al incubador donde se mantuvieron hasta el momento de realizar el siguiente subcultivo celular.

#### 7.5.4. Tratamientos

Las fracciones F2 y F3 seleccionadas para llevar a cabo el tratamiento de las células ARH77 se llevaron a la campana de flujo laminar y bajo condiciones mínimas de luz se prepararon los diferentes tratamientos. A partir de las concentraciones de las fracciones F2 y F3 (Tabla 7-1 Tabla 7-3) se llevaron a cabo los cálculos para preparar las dosis deseadas (Tabla 7-3). Las diluciones necesarias se hicieron utilizando para ello el medio RPMI sin FBS. A continuación, todos los tratamientos se filtraron utilizando filtros de 0,22 micras y se guardaron protegidos de la luz hasta su uso.

**Tabla 7-3. Concentraciones testadas ( $\mu\text{M}$ ) de las fracciones F2 y F3.**

Fracciones	Concentraciones testadas ( $\mu\text{M}$ )				
	50	10	1.0	0,5	0,1
F2	50	10	1.0	0,5	0,1
F3	-	-	1.0	0,5	0,1

#### 7.5.5. Ensayo MTT

Para realizar el ensayo MTT se utilizaron placas P96 donde se sembraron 25000 células/pocillo. Debido a que las células ARH77 son células en suspensión, la metodología empleada para su manejo difiere de la metodología empleada con las células ATDC5.

En primer lugar, se resuspendieron las células en el frasco de cultivo donde se mantenían proliferando, una vez resuspendidas se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer y se calculó el volumen necesario para sembrar 25000 células/pocillo teniendo en cuenta el número de placas P96.

Con el fin de minimizar los errores de siembra, los tratamientos con las fracciones se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga. Para ello, se introdujo 1mL de las células en el interior de Eppendorfs de 2 mL y se centrifugaron a 400 G durante 10 minutos. Posteriormente, se decantó el medio de cada Eppendorf y se le añadió 1 mL de cada

tratamiento correspondiente. A continuación, se adicionaron 100  $\mu$ L de las células tratadas en cada pocillo de las placas P96.

El siguiente paso, fue llevar las células al incubador donde permanecieron en condiciones de oscuridad hasta cuatro horas antes de que finalizara el tratamiento, momento en el que se añadieron 100  $\mu$ L de MTT. Trascurrido el tratamiento a 24 y 48 horas, se añadió el agente solubilizante y se dejaron de nuevo en la incubadora durante 12-16 horas. Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA. Los ensayos se realizaron por triplicado y con octuplicados por cada punto.

#### **7.5.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas Microsoft Excel 2010 y Graph Pad Prism 7.2. Los resultados se representan como la media más la desviación estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparación múltiple Dunnet para comparar los resultados obtenidos. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

#### **7.5.7. Resultados**

Los resultados obtenidos tras el tratamiento de las células ARH77 con la fracción F2 a las concentraciones de 50, 10, 1, 0,5 y 0,1  $\mu$ M concluyeron que la fracción F2 no provocaba mortalidad de las células ARH77 tras 24 horas de tratamiento. En el caso del tratamiento con la fracción F3 a las dosis de 1 y 0,5  $\mu$ M se observó una disminución de la viabilidad celular en un 20 % a la dosis de 0,5  $\mu$ M. (Figura 7.8). Los resultados representan el porcentaje respecto al control de la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes.



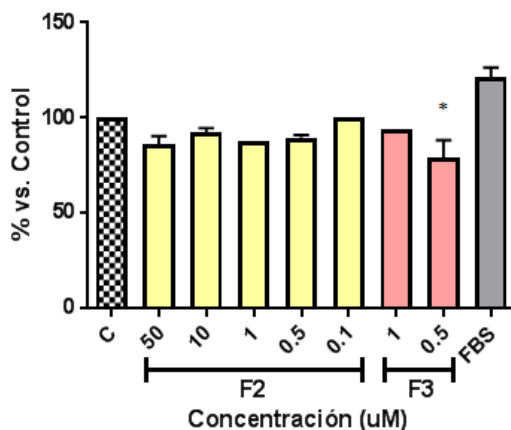


Figura 7.8. Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ARH77 tras 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (50, 10, 1, 0,5 y 0,1) y F3(1, 0,5). \*  $p < 0,05$  C:CONTROL, FBS: control de FBS.

Sin embargo, 48 h después del tratamiento de las células ARH77 con la fracción F2 a la dosis de 50  $\mu\text{M}$  se observó una mortalidad de las células cercana al 50%. El tratamiento con la fracción F2 a una concentración 10  $\mu\text{M}$  causó una mortalidad del 20% aproximadamente siendo este valor estadísticamente no significativo (Figura 7.9).

El tratamiento de las células con la fracción F3 a dosis de 0.5  $\mu\text{M}$  provocó una reducción del 20% de la vitalidad basal (Figura 7.9), sin ser estadísticamente significativo. Los resultados representan el porcentaje respecto al control de la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes.

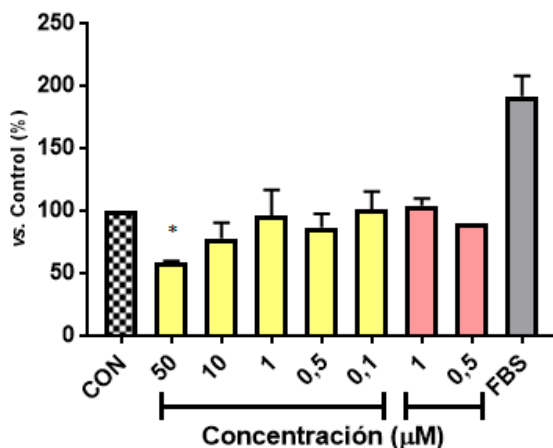


Figura 7.9 Efecto de las fracciones F2 y F3 sobre la vitalidad de las células ARH77 tras 48 horas de tratamiento con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de F2 (50, 10, 1, 0,5 y 0,1) y F3 (1, 0,5). \*  $p < 0,01$ . CON: control, FBS: control de FBS.

## 7.6. LÍNEA CELULAR DE MACRÓFAGOS MURINOS

Con el objetivo de conocer si las fracciones presentaban algún tipo de citotoxicidad sobre macrófagos murinos se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular sobre la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Esta línea celular fue proporcionada por la Dr. Otília Vieira (Centro de Neurociencias y Biología celular, Universidad de Coimbra). Las células se mantuvieron congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Para descongelarlas, se les adicionó 1 mL de medio DMEM y se llevaron a centrifugar durante 5 minutos a 250G. Transcurrido dicho tiempo se procedió a su cultivo en un frasco VWR 734-2313. Los macrófagos murinos RAW 264.7 son células adherentes que crecen adheridas a la superficie de los frascos. Para cultivar dichas células, se le añadió a los frascos el medio DMEM y seguidamente se adicionaron las células. El frasco VWR 734-2313 se llevó al incubador bajo unas condiciones controladas de humedad y

temperatura de 37°C hasta el momento en el que las células alcanzaron la confluencia de 80-90%, momento en el que se procedió a hacer el pase celular de las células RAW 264.7.

### 7.6.1. Preparación del medio

Para la preparación de 500 mL de medio DMEM se requiere disolver 5 g de medio DMEM en 350 mL de agua MilliQ, utilizando para ello un agitador magnético. Seguidamente, se adicionan 1,75g de glucosa (D+Glucosa, Sigma), 0,031g de Penicilina (Penicilim Co-Potassium (SIGMA), 0,05 g de Streptomycin y 50 mg de suero no inactivo, 0,75g NaHCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich) y se mantiene en agitación durante 5-10 minutos. Esta disolución debe tener un pH de 7.2, momento en el que se afora la disolución a 500 mL en un matraz aforado.

A continuación, se lleva a la campana de flujo laminar donde se filtra a través de una unidad de filtración de 0,22µm y se le adicionan 10 mL de FBS (10% de FBS).

### 7.6.2. Test Alarm Blue

Para conocer si las fracciones seleccionadas provocaban alguna citotoxicidad celular sobre los macrófagos RAW 264.7 se trataron con las fracciones seleccionadas y se llevó a cabo el test de Alamar Blue. Gracias a este test se observó el efecto tenían esas fracciones sobre la vitalidad de los macrófagos.

#### 7.6.2.1. Siembra de las células

Se procedió a despegar las células de la base de los frascos VWR. Para ello se rasparon las células con ayuda de un raspador, se recogió todo el medio con las células y se llevaron a un falcón de 15 mL. Se centrifugaron durante 5 minutos a 250G. Posteriormente se decantó el medio y se le adiciono 10 mL de medio nuevo. A continuación, se procedió a contar las células con la ayuda de una cámara de Neubauer. Se tomaron 10 µL de las células y 10 µL de tripan blue y se realizó el conteo.

Se hicieron los cálculos necesarios para sembrar 60.000 células por pocillo en un volumen de 150 µL teniendo en cuenta el número de

placas necesarias. A continuación, se llevaron al incubador donde permanecieron durante 12 horas.

#### 7.6.2.2. Tratamientos

Al día siguiente se procedió a tratar las células con los diferentes tratamientos (F2 y F3). Para ello, se llevaron a cabo las diluciones necesarias para la preparación de las concentraciones a testar.

Una vez preparados todos los tratamientos, se cogió la placa P96 y se aspiró el medio de los pocillos y se adiciono 150 uL de cada tratamiento. Una vez tratadas se llevaron al incubador hasta el día siguiente.

#### 7.6.2.3. Test de vitalidad

Al día siguiente se llevó a cabo el test de vitalidad. Para ello 4 horas antes de que termine el tratamiento se añadió la resazurina (50 uM) en todos los pocillos de la placa del test de vitalidad.

Se llevo a cabo la preparación del reactivo Alarm Blue.

Se añadió a cada pocillo 20 µL de resazurina (stock 500 micromolar e concentração final 50 micromolar). Se llevo a la incubadora durante 3 horas a 37 °C y posteriormente se procedió a la lectura de los resultados en un espectofotómetro (SLT, Salzburg, Austria) a la longitud de onda de 570 nm y 620nm.

### 7.6.3. Inhibición de la producción de nitritos

#### 7.6.3.1. Siembra de las células

El procedimiento llevado a cabo para la siembra de las células es el mismo descrito en el apartado 7.6.2.1.

#### 7.6.3.2. Tratamientos

Para el ensayo de inhibición de producción de nitritos se añadieron los tratamientos pero junto con el LPS. Para ello se aspiran todos pocillos y se añadió 150 µL de cada tratamiento y seguidamente se añade 1 µL de LPS (cuya concentración final es de 50 mg/ml de LPS). Se dejo en la incubadora 24horas hasta el día siguiente.

### 7.6.3.3. Ensayo

Se tomó la placa del ensayo del incubador y se retiró 130  $\mu\text{L}$  que se depositaron en una placa P96. Se le añadió a dicha placa P96 unos 130  $\mu\text{L}$  del reactivo preparado. A continuación, se llevó a cabo la preparación de la recta patrón (130  $\mu\text{L}$  de cada tubo Falcon) y se añadió a cada pocillo 130  $\mu\text{L}$  del reactivo preparado.

Se dejó incubar durante 30 minutos en oscuridad y finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm.

Se calculó la concentración de nitritos a través de una recta patrón de nitrito de sodio.

### 7.6.4. Resultados

#### 7.6.4.1. Test de vitalidad

Tras el tratamiento de los macrófagos RAW 267.4 con las diferentes fracciones a diferentes concentraciones se puede concluir que los tratamientos ensayados no produjeron una mortalidad en los macrófagos murinos RAW 267.4. En cuanto a la fracción F3 a la dosis 0,5 y 0,25  $\mu\text{M}$  se observó un incremento del metabolismo celular. Este hecho puede deberse a un aumento en la respiración mitocondrial o a un aumento en la acción proliferativa (Figura 7.10).

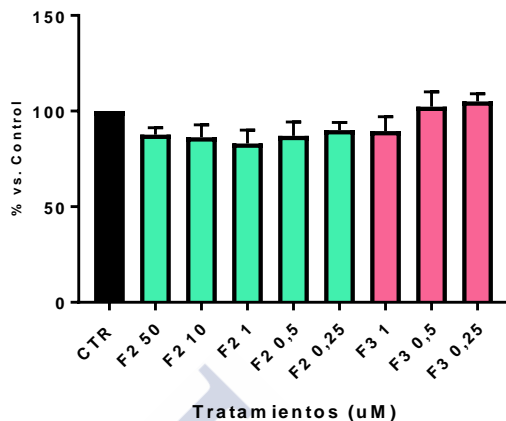


Figura 7.10. Vitalidad de los macrófagos RAW 264.7 después del tratamiento con diferentes concentraciones de las fracciones F2 y F3.

#### 7.6.4.2. Inhibición de la producción de óxido nítrico

Los macrófagos RAW 254.7 fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* aumentando la producción de nitritos. Tras el tratamiento durante 24 horas con las diferentes fracciones a diferentes concentraciones se llevó a cabo la determinación de nitritos mediante el reactivo de Griess. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento de los macrófagos estimulados con la fracción F2 a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , inhibía la producción de nitritos en un 40 % aproximadamente. Del resto de tratamientos testados, sólo la F2 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y la F3 a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  produjeron una disminución de la producción de nitritos del 10 % (Figura 7.11).

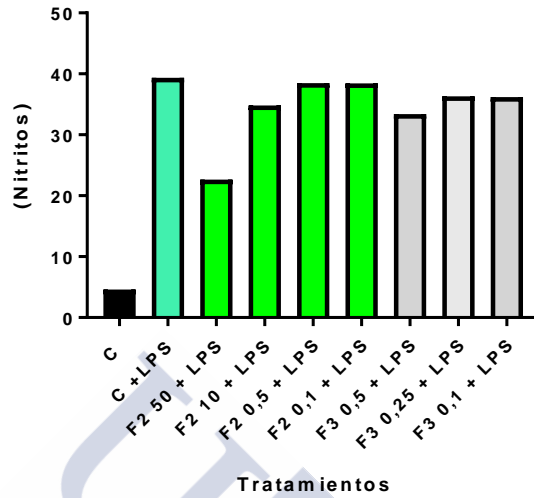



Figura 7.11 Células RAW 267.4 después del tratamiento con F2 y F3 a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ). Los resultados representan un experimento con 2 observaciones. \* C:Control, LPS: lipopolisacárido de bacteria gram -, F2 y F3 fracciones.





A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

## **8. CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONS**



## 8. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

### CONCLUSIONES

- El estudio de secado permitió concluir que el aumento de la temperatura de secado de 35 a 75 °C produce una inhibición de DPPH del 90 % en el caso de *Bifurcaria bifurcaria* y del 70 % con *Fucus vesiculosus*. Además, con *Fucus vesiculosus* se constató que el secado a una temperatura de 75 °C destruía la capacidad antioxidante de los extractos de *Fucus vesiculosus*.
- *Bifurcaria bifurcata* da lugar a fracciones de florotaninos más ricas en polifenoles totales en comparación con *Fucus vesiculosus*. Por este motivo, se ha seleccionado *Bifurcaria bifurcata* para llevar a cabo la obtención de compuestos bioactivos con el objetivo de testar su bioactividad en diferentes líneas celulares murinas y humanas.
- La metodología seguida para la extracción de fucoidanos da lugar a 9 fracciones. Algunas de ellas fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos de bioactividad, relacionadas con la inhibición de la producción de nitritos, pero no se observó ninguna actividad inhibitoria.
- La metodología de extracción llevada a cabo preconcentrando los florotaninos en Amberlite y posterior cromatografía semipreparativa en fase reversa C18, dio lugar a 4 fracciones polifenólicas, denominadas F9, F14, F32 y F37. La fracción F9 corresponde al dímero de floroglucinol y la fracción F14 es una fracción oligomérica, ambas son fracciones de menor tamaño que las fracciones F32 y F37. Todas las fracciones se

utilizaron para llevar a cabo ensayos sobre actividad biológica. De las fracciones F9 y F14, solo la fracción F14 a la dosis 100  $\mu\text{M}$  demostró una actividad antiproliferativa significativa en la línea celular de teratocarcinoma de ratón. Sin embargo, la fracción F9 a la misma dosis de 100  $\mu\text{M}$  sugiere un potencial efecto antiproliferativo. No obstante, este efecto no es estadísticamente significativo. Las fracciones F32 y F37 no poseen ningún efecto antiproliferativo, inclusive a dosis de 100  $\mu\text{M}$ , a 24 horas de tratamiento. Por otra parte, la fracción F32 a la dosis de 100  $\mu\text{M}$  demostró poseer una actividad antiproliferativa altamente significativa tras 48 horas de tratamiento.

- La extracción acuosa asistida por ultrasonido da lugar a 2 fracciones, F2 y F3, conteniendo florotaninos y otros compuestos. F2 muestra actividad antiproliferativa “dosis dependiente” en las células de teratocarcinoma murino a 24 y a 48 h. F3 no modifica la vitalidad celular tras 24 o 48 h de incubación.
- F2 y F3 muestran una parcial actividad antiproliferativa en la línea de mieloma múltiple humano a la dosis de 50  $\mu\text{M}$  para F2 y la F3 parece tener una potencial actividad antiproliferativa a la dosis de 0,5  $\mu\text{M}$ . Estos resultados no se pueden considerar concluyentes en cuanto no se ha dispuesto de suficientes fracciones para conseguir resultados significativos.
- F2 y F3 muestran una parcial actividad antiproliferativa en la línea de mieloma múltiple humano a la dosis de 50  $\mu\text{M}$  para F2 y la F3 parece tener una potencial actividad antiproliferativa a la dosis de 0,5  $\mu\text{M}$ . Con más muestras estos prometedores resultados se podrían esperar mejores resultados estadísticos.

- Los ensayos realizados para testar la mortalidad de macrófagos de ratón empleando F2 y F3 indican que no poseen ningún efecto citotóxico en estas células. Esto es interesante ya que los macrófagos son las células del sistema inmunitario innato que acuden ante los procesos implicados en ciertos tipos de enfermedades inflamatorias incluso en el cáncer.
- Un ensayo preliminar sobre la posible actividad antiinflamatoria de F2 y F3 arrojó buenos resultados. F2 a 50  $\mu$ M disminuye la concentración de nitritos en células de macrófagos estimuladas con LPS. F2 podría ejercer una actividad citotóxica y a la vez antiinflamatoria en un ambiente tumoral. Asimismo, se espera que esta fracción pueda tener efectos antiinflamatorios en la línea condrogénica ATDC5, independientemente de sus efectos citotóxicos, en particular inhibiendo la nitróxido sintasa Tipo 2 en condrocitos.



## CONCLUSIONS

- The drying study concludes that the increase of temperature from 35 up to 75 °C produce an inhibition of DPPH of 90% in the case of *Bifurcaria bifurcata* and of 70% in the case of *Fucus vesiculosus*. Furthermore, at temperature of 75°C destroyed the antioxidant capacity of *Fucus vesiculosus* extracts.
- *Bifurcaria bifurcata* show fractions of phlorotannins richer in total polyphenol in comparison with *Fucus vesiculosus*. For this reason, *Bifurcaria bifurcata* has been selected to obtain bioactive compounds with the aim to study the bioactivity in diverse murine and human cell lines.
- The extraction methodology of fucoidans gives 9 fucoidans fractions. Some of them were used to carry out bioactivity assays, related to the inhibition of nitrite production, but inhibition activity was no observed.
- Methodology extraction followed by preconcentration of phlorotannins in Amberlite and subsequent reverse phase semipreparative chromatography, rises 4 polyphenolic fractions (F9, F14, F32 and F37). F9 is a dimeric of phloroglucinol and F14 is an oligomeric fraction, both smaller than F32 and F37. Regarding to F9 and F14, only F14 at 100 µM dose shows significant antiproliferative activity in the murine teratocarcinome cell line. However, F9 at the same dose suggests a potential antiproliferative effect (not statistical significance). F32 and F37 do not have any antiproliferative effect, even at 100 µM dose after 24 hr. F32 at 100 µM shows a highly significant antiproliferative activity after 48 hr.

- Ultrasound assisted extraction gives place 2 fractions, F2 and F3, containing phlorotannins and other compounds. F2 shows a "dose dependent" antiproliferative activity in the murine teratocarcinome cells at 24 and 48 hr. F3 does not modify cellular vitality after 24 or 48 hr of incubation.
- F2 and F3 show a partial antiproliferative activity at 50  $\mu\text{M}$  dose in the human multiple myelome cell line. F3 seems to have a potential antiproliferative activity at the dose of 0.5  $\mu\text{M}$ . The use of more samples could validate statistically these promising results.
- The assays carried out in murine macrophage cells with the aim to determine if F2 and F3 produce mortality of macrophage indicate that both fractions don't show cytotoxic effect in this cell line. This is interesting since macrophages are the cells of the innate immune system that are involved in certain types of inflammatory diseases, including cancer.
- A preliminary trial on the possible anti-inflammatory activity of F2 and F3 show good results. F2 at 50  $\mu\text{M}$  decreased the concentration of nitrites in previously stimulated murine macrophage cells with LPS. F2 could have a cytotoxic and anti-inflammatory activity in a tumoral environment. It can be hypothesized that this fraction may have anti-inflammatory effects also in the chondrogenic line ATDC5, independently of its cytotoxic effects, particularly inhibiting type 2 nitroxide synthase in chondrocytes.







## **9. REFERENCIAS**



## 9. REFERENCIAS

- Agregán, Rubén, Paulo E.S. Munekata, Daniel Franco, et al. 2017. "Phenolic Compounds from Three Brown Seaweed Species Using LC-DAD-ESI-MS/MS." *Food Research International* 99: 979–85.
- Agregán, Rubén, Paulo E. Munekata, Ruben Domínguez, et al. 2017. "Proximate Composition, Phenolic Content and in Vitro Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of the Seaweeds *Ascophyllum Nodosum*, *Bifurcaria Bifurcata* and *Fucus Vesiculosus*. Effect of Addition of the Extracts on the Oxidative Stability of Canola Oil Unde." *Food Research International* 99: 986–94.
- Ahmed, Musheer, and Zahid H. Khan. 2000. "Electronic Absorption Spectra of Benzoquinone and Its Hydroxy Substituents and Effect of Solvents on Their Spectra." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 56(5): 965–81.
- Airanthi, M. K. Widjaja Adhi, Masashi Hosokawa, and Kazuo Miyashita. 2011. "Comparative Antioxidant Activity of Edible Japanese Brown Seaweeds." *Journal of Food Science* 76(1).
- Alves, Celso et al. 2016. "Bifurcaria Bifurcata: A Key Macro-Alga as a Source of Bioactive Compounds and Functional Ingredients." *International Journal of Food Science and Technology* 51(7): 1638–46.
- Anastyuk, Stanislav D. et al. 2010. "Structural Analysis of a Highly Sulfated Fucan from the Brown Alga *Laminaria Cichorioides* by Tandem MALDI and ESI Mass Spectrometry." *Carbohydrate Research* 345(15): 2206–12.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.043>.
- Anastyuk, et al. 2012. "Anticancer Activity in Vitro of a Fucoidan from the Brown Alga *Fucus Evanesens* and Its Low-Molecular Fragments, Structurally Characterized by Tandem Mass-

- Spectrometry.” *Carbohydrate Polymers* 87(1): 186–94.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.036>.
- Anastyuk et al. 2017. “Structural Features and Anticancer Activity in Vitro of Fucoidan Derivatives from Brown Alga *Saccharina Cichorioides*.” *Carbohydrate Polymers* 157: 1503–10.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.031>.
- Ariede, Maíra Bueno et al. 2017. “Cosmetic Attributes of Algae - A Review.” *Algal Research* 25(January): 483–87.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>.
- Audibert, L. et al. 2010. “Phenolic Compounds in the Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum*: Distribution and Radical-Scavenging Activities.” *Phytochem. Anal.* 21: 399–405.
- Beedesseea, Girish et al. 2012. “Cytotoxic Activities of Hexane , Ethyl Acetate and Butanol Extracts of Marine Sponges from Mauritian Waters on Human Cancer Cell Lines.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34(2): 397–408.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.013>.
- Benzie, I.F.F., and J.J. Strain. 1999. “Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration.” *Methods Enzymol.* 299: 15–27.
- Berteau, Olivier, and Barbara Mulloy. 2003. “Sulfated Fucans , Fresh Perspectives : Structures , Functions , and Biological Properties of Sulfated Fucans and an Overview of Enzymes Active toward This Class of Polysaccharide.” 13(6): 29–40.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.” *Food Sci. Technol* 28: 25–30.
- Caraco, Nina, Jonathan Cole, Stuart Findlay, and Cathleen Wigand. 2006. “Vascular Plants as Engineers of Oxygen in Aquatic Systems.” *BioScience* 56(3): 219.
- Catarino, Marcelo D, Artur M S Silva, and Susana M Cardoso. 2017. “Fucaceae : A Source of Bioactive Phlorotannins.”
- Cencic, Avrelija, and Walter Chingwaru. 2010. “The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health.” *Nutrients* 2(6): 611–25.

- Cole, Andrew J., Rocky de Nys, and Nicholas A. Paul. 2015. "Biorecovery of Nutrient Waste as Protein in Freshwater Macroalgae." *Algal Research* 7: 58–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.005>.
- Craigie, James S. 2011. "Seaweed Extract Stimuli in Plant Science and Agriculture." *Journal of Applied Phycology* 23(3): 371–93.
- Darcy-Vrillon, Béatrice. 1993. "Nutritional Aspects of the Developing Use of Marine Macroalgae for the Human Food Industry." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 44(November): S23–35.
- Dias, Paulo Fernando et al. 2005. "Antiangiogenic and Antitumoral Properties of a Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Sargassum Stenophyllum*." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56(4): 436–46.
- Díez, I et al. 2012. "Estuarine , Coastal and Shelf Science Seaweed Assemblage Changes in the Eastern Cantabrian Sea and Their Potential Relationship to Climate Change." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 99: 108–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2011.12.027>.
- Ding, Lanping, Yuan Yuan Ma, Bingxin Huang, and Shanwen Chen. 2013. "Effects of Seawater Salinity and Temperature on Growth and Pigment Contents in *Hypnea Cervicornis* J . Agardh ( Gigartinales , Rhodophyta )." 2013.
- Dodgson, K S. 1961. "Determination of Inorganic Sulphate in Studies on the Enzymic and Non-Enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters." *The Biochemical journal* 78: 312–19.
- Dubois, Michel et al. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry* 28(3): 350–56.
- Eisenbrand, G et al. 2002. "Methods of in Vitro Toxicology." 40: 193–236.
- Endo, Hikaru, Kentaro Suehiro, Xu Gao, and Yukio Agatsuma. 2017. "Interactive Effects of Elevated Summer Temperature , Nutrient Availability , and Irradiance on Growth and Chemical Compositions of Juvenile Kelp , *Eisenia Bicyclis*." (November 2016): 118–26.

- Flórez-Fernández, Noelia et al. 2017. "Ultrasound-Assisted Extraction of Fucoidan from Sargassum Muticum." *Journal of Applied Phycology* 29(3): 1553–61.
- Von Gadow, A., E. Joubert, and H. Hansmann. 1997. "Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus Linearis*),  $\alpha$ -Tocopherol, BHT, and BHA." *J. Agric. Food Chem.*, 45(3): 632–38.
- El Gamal, Ali A. 2010. "Biological Importance of Marine Algae." *Saudi Pharmaceutical Journal* 18(1): 1–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>.
- Garbary, David J., Angela Brackenbury, Alicia M. McLean, and Daniel Morrison. 2006. "Structure and Development of Air Bladders in *Fucus* and *Ascophyllum* (Fucales, Phaeophyceae)." *Phycologia* 45(September): 557–66.
- García-Vaquero, M., G. Rajauria, J. V. O'Doherty, and T. Sweeney. 2017. "Polysaccharides from Macroalgae: Recent Advances, Innovative Technologies and Challenges in Extraction and Purification." *Food Research International* 99: 1011–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.016>.
- Glombitza, K., et al. (1976). "Polyhydroxyoligophenyle und phenylather aus *Bifurcaria Bifurcata*\*Karl-Werner." *Phytochemistry* 15: 1279–81.
- González, Concepción, Oscar García Álvarez, and Luis Miguel Rodríguez. 1998. *Algas Mariñas de Galicia*.
- Goswami, Sumanta Kumar et al. 2016. "Antioxidant Potential and Ability of Phloroglucinol to Decrease Formation of Advanced Glycation End Products Increase Efficacy of Sildenafil in Diabetes-Induced Sexual Dysfunction of Rats." *Sexual Medicine* 4(2): e104–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.esxm.2015.12.002>.
- Hahn, Thomas, Siegmund Lang, Roland Ulber, and Kai Muffler. 2012. "Novel Procedures for the Extraction of Fucoidan from Brown Algae." *Process Biochemistry* 47(12): 1691–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.016>.
- Heffernan, Natalie, Nigel P. Brunton, Richard J. FitzGerald, and Thomas J. Smyth. 2015. "Profiling of the Molecular Weight and Structural Isomer Abundance of Macroalgae-Derived

- Phlorotannins.” *Marine Drugs* 13(1): 509–28.
- Hii, Siew-ling et al. 2010. “Stability Studies of Fucoxanthin From *Sargassum Binderi*.” 4(10): 4580–84.
- Hiscock, Keith, Alan Southward, Ian Tittley, and Stephen Hawkins. 2004. “Effects of Changing Temperature on Benthic Marine Life in Britain and Ireland.” *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14(4): 333–62.
- Hu, Pei et al. 2016. “Structural Elucidation and Protective Role of a Polysaccharide from *Sargassum Fusiforme* on Ameliorating Learning and Memory Deficiencies in Mice.” *Carbohydrate Polymers* 139: 150–58.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.019>.
- Hwang, Pai An, Yu Lan Hung, and Shih Yung Chien. 2015. “Inhibitory Activity of *Sargassum Hemiphyllum* Sulfated Polysaccharide in Arachidonic Acid-Induced Animal Models of Inflammation.” *Journal of Food and Drug Analysis* 23(1): 49–56.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.05.004>.
- Iacono, Anna et al. 2010. “Effect of Oleocanthol and Its Derivatives on Inflammatory Response Induced by Lipopolysaccharide in a Murine Chondrocyte Cell Line.” *Arthritis and Rheumatism* 62(6): 1675–82.
- Ignat, Ioana et al. 2013. “Antioxidant and antibacterial activiteies of some natural polyphenols”. 47: 387–99.
- Jiang, Zedong, Takasi Okimura, Kenichi Yamaguchi, and Tatsuya Oda. 2011. “The Potent Activity of Sulfated Polysaccharide, Ascophyllan, Isolated from *Ascophyllum Nodosum* to Induce Nitric Oxide and Cytokine Production from Mouse Macrophage RAW264.7 Cells: Comparison between Ascophyllan and Fucoidan.” *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 25(4): 407–15.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.10.001>.
- Jin, Weihua, Quanbin Zhang, Jing Wang, and Wenjing Zhang. 2013. “A Comparative Study of the Anticoagulant Activities of Eleven Fucoidans.” *Carbohydrate Polymers* 91(1): 1–6.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.067>.
- Jing Wang, Quanbin Zhang, Zhongshan Zhang, Zhien Li. 2008. “Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharide Fractions

- Extracted from *Laminaria Japonica*.” *International Journal of Biological Macromolecules* 42: 127–32.
- Kang, Sung-myung et al. 2011. “Evaluation of Antioxidant Properties of a New Compound , Pyrogallol-Phloroglucinol -6 , 6 ’ -Bieckol Isolated from Brown Algae , *Ecklonia Cava*.” 5(6): 495–502.
- Kirke, D. A. et al. 2017. “The Chemical and Antioxidant Stability of Isolated Low Molecular Weight Phlorotannins.” *Food Chemistry* 221(December 2017): 1104–12.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.050>.
- Koivikko, Riitta, Jyrki Loponen, Tuija Honkanen, and Veijo Jormalainen. 2005. “Contents of Soluble, Cell-Wall-Bound and Exuded Phlorotannins in the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*, with Implications on Their Ecological Functions.” *Journal of Chemical Ecology* 31(1): 195–212.
- Koivikko, Riitta, Jyrki Loponen, Kalevi Pihlaja, and Veijo Jormalainen. 2007. “High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Phlorotannins from the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*.” *Phytochemical Analysis* 18(4): 326–32.
- Kyung, In et al. 2015. “Simultaneous Determination of 15 Phenolic Compounds and Caffeine in Teas and Mate Using RP-HPLC / UV Detection: Method Development and Optimization of Extraction Process.” *Food Chemistry* 172: 469–75.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.050>.
- Lawton, Rebecca J. et al. 2017. “The Industrial Ecology of Freshwater Macroalgae for Biomass Applications.” *Algal Research* 24: 486–91.
- Lee, Robert Edward. 2008. *Phycology Basic Characteristics of the Algae*.  
<http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO97805118128977>.
- Lefevre-Balleydier, Anne. 2003. *Mares y Océanos*. ed. SPES EDITORIAL S.L LAROUSSE.
- Li, Bo, Xin Jun Wei, Jun Liang Sun, and Shi Ying Xu. 2006. “Structural Investigation of a Fucoïdan Containing a Fucose-Free Core from the Brown Seaweed, *Hizikia Fusiforme*.” *Carbohydrate Research* 341(9): 1135–46.
- Li, Yajing et al. 2017. “Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum Fusiforme* (Harvey) Setchell.”



- Marine Drugs* 15(2).
- Li, Yong-Xin, Isuru Wijesekara, Yong Li, and Se-Know Kim. 2011. "Phlorotannins as Bioactive Agents from Brown Algae." *Process Biochemistry* 46(12): 2219–24.
- Liu, Xin et al. 2016. "Extraction, Fractionation, and Chemical Characterisation of Fucoindans from the Brown Seaweed *Sargassum Pallidum*." *Czech Journal of Food Sciences* 34(5): 406–13.
- Lorenzo, José M, Jorge Sineiro, Isabel R Amado, and Daniel Franco. 2014. "Influence of Natural Extracts on the Shelf Life of Modified Atmosphere-Packaged Pork Patties." *Meat Science* 96: 526–34.
- Martínez, José Hipólito Isaza, and Harlen Gerardo Torres Castañeda. 2013. "Preparation and Chromatographic Analysis of Phlorotannins." (51): 825–38.
- Mišurcová, Ladislava. 2011. "Chemical Composition of Seaweeds." In *Handbook of Marine Macroalgae*, , 171–92. <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119977087.ch7>.
- Montero, Lidia et al. 2016. "Anti-Proliferative Activity and Chemical Characterization by Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry of Phlorotannins from the Brown Macroalga *Sargassum Muticum* Collected on North-Atlantic Coasts." *Journal of Chromatography A* 1428: 115–25. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315010213>.
- Moreau, Dimitri et al. 2006. "An Extract from the Brown Alga *Bifurcaria Bifurcata* Induces Irreversible Arrest of Cell Proliferation in a Non-Small-Cell Bronchopulmonary Carcinoma Line." *Journal of Applied Phycology* 18(1): 87–93.
- Moreira, Ramón et al. 2016. "Water Sorption Isotherms and Air Drying Kinetics of *Fucus Vesiculosus* Brown Seaweed." *Journal of Food Processing and Preservation* 41(4).
- Arufe, S. et al. 2017. "Aqueous Extracts of *Ascophyllum Nodosum* Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction: Effects of Drying Temperature of Seaweed on the Properties of Extracts." *Journal of Applied Phycology* 29(6): 3191–3200.

- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63.
- Moure, A. et al. 2001. "Antioxidant Activity of Extracts from Gevuina Avellana and Rosa Rubiginosa Defatted Seeds." *Food Res. Int.* 33: 103–9.
- Müller, Ruth, Thomas Laepple, Inka Bartsch, and Christian Wiencke. 2009. "Impact of Oceanic Warming on the Distribution of Seaweeds in Polar and Cold-Temperate Waters Impact of Oceanic Warming on the Distribution of Seaweeds in Polar and Cold-Temperate Waters." (December).
- Murata, M, and J Nakazoe. 2001. "Production and Use of Marine Algae in Japan." *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly* 35(4): 281–90.
- Nagaoka, M et al. 2000. "Anti-Ulcer Effects and Biological Activities of Polysaccharides from Marine Algae." *BioFactors (Oxford, England)* 12(1–4): 267–74.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11216495>.
- Nakai, Masaaki, Norihiko Kageyama, Koichi Nakahara, and Wataru Miki. 2006. "Phlorotannins as Radical Scavengers from the Extract of Sargassum Ringgoldianum." *Marine Biotechnology* 8(4): 409–14.
- Nygård, Charlotta A, and Matthew J Dring. 2008. "Influence of Salinity , Temperature , Dissolved Inorganic Carbon and Nutrient Concentration on the Photosynthesis and Growth of Fucus Vesiculosus from the Baltic and Irish Seas Influence of Salinity , Temperature , Dissolved Inorganic Carbon and Nutrient Concentration on the Photosynthesis and Growth of Fucus Vesiculosus from the Baltic and Irish Seas." 0262(September 2017).
- O'Brien, N.M., J.A. Woods, S.A. Aherne, and Y.C. O'Callaghan. 2000. "Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Reactions in Cell Culture Models: Modulatory Effects of Phytochemicals." *Biochemical Society Transactions* 28(1): A7.4-A7.  
<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst028a007c>.
- Okolie, Chigozie Louis et al. 2017. "Prospects of Brown Seaweed

- Polysaccharides (BSP) as Prebiotics and Potential Immunomodulators.” *Journal of Food Biochemistry* 41(5): 1–12.
- Parys, Sabine et al. 2007. “Evaluation of Quantitative Methods for the Determination of Polyphenols in Algal Extracts.” *Journal of natural products* 70(Revised June 25, 2007): 1865–70. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np070302f>.
- Peng, Juan, Jian-ping Yuan, Chou-fei Wu, and Jiang-hai Wang. 2011. “Fucoxanthin , a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms : Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health.” : 1806–28.
- Pinteus, Susete et al. 2017. “Antioxidant and Cytoprotective Activities of Fucus Spiralis Seaweed on a Human Cell in Vitro Model.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(2): 1–14.
- Plaza, Merichel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibáñez. 2008. “In the Search of New Functional Food Ingredients from Algae.” *Trends in Food Science and Technology* 19(1): 31–39.
- Pozharitskaya, Olga N et al. 2018. “Pharmacokinetic and Tissue Distribution of Fucoidan from Fucus Vesiculosus after Oral Administration to Rats.” : 1–10.
- Radojkovi, Marija et al. 2012. “Optimization of Solid-Liquid Extraction of Antioxidants from Black Mulberry Leaves by Response Surface Methodology.” 50(2): 167–76.
- Ragan, M.A, and K.W Glomblitz. 1986. 4 Progress in Phycological Research *Phlorotannins, Brown Algal Polyphenols*. Biopress Ltd. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10027506516/en/> (July 23, 2018).
- Rajapakse, Niranjana, and Se Kwon Kim. 2011. “Nutritional and Digestive Health Benefits of Seaweed.” In *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier Inc., 17–28. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00002-8>.
- Rhein-knudsen, Nanna, Marcel Tutor Ale, and Anne S Meyer. 2015. “Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies.” : 3340–59.
- Rioux, Laurie Eve, Lucie Beaulieu, and Sylvie L. Turgeon. 2017. “Seaweeds: A Traditional Ingredients for New Gastronomic Sensation.” *Food Hydrocolloids* 68: 255–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.005>.

- Rodriguez-Jasso, R. et al. 2011. "Microwave-Assisted Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) from Brown Seaweed." *Carbohydr. Polym.* 86: 1137–44.
- Roh, Myong-kyun, Salim Uddin, and Byung-soo Chun. 2008. "Extraction of Fucoxanthin and Polyphenol from *Undaria Pinnatifida* Using Supercritical Carbon Dioxide with Co-Solvent." : 724–29.
- Shang, Qingsen et al. 2017. "Dietary Fucoidan Improves Metabolic Syndrome in Association with Increased Akkermansia Population in the Gut Microbiota of High-Fat Diet-Fed Mice." *Journal of Functional Foods* 28: 138–46.
- Shibata, H et al. 2000. "Properties of Fucoidan from *Cladosiphon Okamuranus* Tokida in Gastric Mucosal Protection." *Biofactors* 11(4): 235–45.
- Shibata, Hideyuki et al. 2003. "Preventive Effects of *Cladosiphon* Fucoidan against *Helicobacter Pylori* Infection in Mongolian Gerbils." *Helicobacter* 8(1): 59–65.
- Sineiro Torres, Jorge, Marivel Sánchez Guerrero, and María José Núñez García. 2014. "Extracto Antioxidante a Partir de Macroalgas Pardas y Procedimiento de Obtención."
- Singleton, V L, and Joseph A Rossi Jr. 1965. "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents." *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144–58. <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/16/3/144>.
- Sjøtun, Kjersti, Vivian Husa, Lars Asplin, and Anne Dagrun Sandvik. 2015. "Climatic and Environmental Factors Influencing Occurrence and Distribution of Macroalgae — a Fjord Gradient Revisited." 532: 73–88.
- Spavieri, Jasmine et al. 2010. "Antimycobacterial, Antiprotozoal and Cytotoxic Potential of Twenty-One Brown Algae (Phaeophyceae) from British and Irish Waters." *Phytotherapy Research* 24(11): 1724–29.
- Steevensz, Aaron J et al. 2012. "Pro Fi Ling Phlorotannins in Brown Macroalgae by Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry." (November 2011): 547–53.
- SUGIURA, Yoshimasa et al. 2007. "Anti-Allergic Phlorotannins from

- the Edible Brown Alga, *Eisenia Arborea*.” *Food Science and Technology Research* 13(1): 54–60.  
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/fstr/13.54?from=CrossRef>.
- Suleria, Hafiz Ansar Rasul, Simone Osborne, Paul Masci, and Glenda Gobe. 2015. “Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries.” *Marine Drugs* 13(10): 6336–51.
- Tay, Pei Yin et al. 2014. “Assessment of Extraction Parameters on Antioxidant Capacity, Polyphenol Content, Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin Gallate (ECG) and Iriflophenone 3-C- $\beta$ -Glucoside of Agarwood (*Aquilaria Crassna*) Young Leaves.” 60: 12304–19.
- Thomas, Noel Vinay, and Se Kwon Kim. 2011. “Potential Pharmacological Applications of Polyphenolic Derivatives from Marine Brown Algae.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32(3): 325–35.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2011.09.004>.
- Thuy, Thanh Thi Thu et al. 2015. “Anti-HIV Activity of Fucoidans from Three Brown Seaweed Species.” *Carbohydrate Polymers* 115: 122–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.068>.
- Viana, Inés G, Antonio Bode, and Consolación Fernández. 2015. “Ecology of *Fucus Vesiculosus* ( Phaeophyceae ) at Its Southern Distributional Limit: Growth and Production of Early Developmental Stages Ecology of *Fucus Vesiculosus* ( Phaeophyceae ) at Its Southern Distributional Limit: Growth and Production of Early Developmental Stages.” *European Journal of Phycology* 50(3): 247–59.  
<http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2015.1013159>.
- Wang, Hui Min David, Ching Chun Chen, Pauline Huynh, and Jo Shu Chang. 2015. “Exploring the Potential of Using Algae in Cosmetics.” *Bioresource Technology* 184: 355–62.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>.
- Wang, Tao et al. 2012. “Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus Vesiculosus*.” *J Agr Food Chem* 60(23): 5874–83.  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf3003653>.

- Wang, Yanfang et al. 2016. "Effects of Seaweed Fertilizer on the Growth of *Malus Hupehensis* Rehd. Seedlings, Soil Enzyme Activities and Fungal Communities under Replant Condition." *European Journal of Soil Biology* 75: 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.04.003>.
- Yabur, Ricardo, Yoav Bashan, and Gustavo Hern. 2007. "Alginate from the Macroalgae *Sargassum Sinicola* as a Novel Source for Microbial Immobilization Material in Wastewater Treatment and Plant Growth Promotion." : 43–53.
- Yang, Chen et al. 2008. "Effects of Molecular Weight and Hydrolysis Conditions on Anticancer Activity of Fucoidans from Sporophyll of *Undaria Pinnatifida*." *International Journal of Biological Macromolecules* 43(5): 433–37.
- Yang, Ming, Liang Li, Seok Mo Heo, and Yunjo Soh. 2016. "Aloe-Emodin Induces Chondrogenic Differentiation of ATDC5 Cells via MAP Kinases and BMP-2 Signaling Pathways." *Biomolecules and Therapeutics* 24(4): 395–401.
- Yao, Yongchang, and Yingjun Wang. 2013. "ATDC5: An Excellent in Vitro Model Cell Line for Skeletal Development." *Journal of Cellular Biochemistry* 114(6): 1223–29.
- Zaporozhets, T. S. et al. 2014. "The Prebiotic Potential of Polysaccharides and Extracts of Seaweeds." *Russian Journal of Marine Biology* 40(1): 1–9. <http://link.springer.com/10.1134/S1063074014010106>.
- Zhang, Quanbin et al. 2005. "Fucoidan Inhibits the Development of Proteinuria in Active Heymann Nephritis." *Phytotherapy Research* 19(1): 50–53.
- Zou, Yanping et al. 2008. "Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige Okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems." *Journal of agricultural and food chemistry* 56(16): 7001–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616277>.
- Zubia, Mayalen et al. 2009. "Antioxidant and Antitumoural Activities of Some Phaeophyta from Brittany Coasts." *Food Chemistry* 116:693–701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>.

